

**MOLEKULAR-BIOLOGISCHE ASPEKTE
DES RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEMS**

Maria Rickert



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547927_0073

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr.h.c. Klaus Thureau

Prof. Dr. med. Gerrit ten Bruggencate

Prof. Dr. med. Eckehart Gerlach

MOLEKULAR-BIOLOGISCHE ASPEKTE DES
RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEMS

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Maria Rickert

aus

München

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. K. Thureau

.....

Mitberichterstatter: Prof. Dr. V. Herzog

Prof. Dr. H.H. Edel

Mitbetreuung durch
den promovierten
Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen 23.12.1986
Prüfung:

INHALTSVERZEICHNIS

I.	Einleitung	1
II.	Lokalisation von Angiotensinogen, Angiotensin I, Angiotensin II und Converting Enzym in den juxtaglomerulären Zellen.	
1.	Immunochemische Untersuchungen	12
2.	Histohybridisierung	17
III.	Renin-Angiotensin-System-Komponenten als nichtsekretorische Proteine	27
1.	Renin	
1.1.	Genstruktur	32
1.1.1.	Struktur des Renin-Gens beim Menschen	34
1.1.2.	Struktur des Renin-Gens bei der Maus	36
1.1.3.	Struktur des Pepsinogen-Gens	37
1.2.	Gentranskription	37
1.2.1.	Renin-Gen-Transkription beim Menschen	39
1.2.2.	Renin-Gen-Transkription bei der Maus	44

1.3.	Spleißprozess	50
1.3.1.	Spleißen der Renin-mRNA beim Menschen und Maus	51
1.4 .	Renin-Aminosäuresequenz beim Menschen und bei der Maus	54
2.	Angiotensin	61
2.1.	Angiotensinogen-Gen-Struktur bei der Ratte	
2.2.	Angiotensinogen-Gen-Transkription	65
2.3.	Angiotensinogen-Aminosäuresequenz	69
2.3.1.	Vergleich zwischen der Aminosäuresequenz des Angio- tensinogens von Ratte und Mensch	73
2.3.2.	Vergleich zwischen Angioten- sinogen und α_1 -Anti- trypsin	74
IV.	Die intrazelluläre Angiotensin II-Wirkung	77
V.	Diskussion	83
VI.	Zusammenfassung	91
VII.	Literaturverzeichnis	92

I. EINLEITUNG

Die Niere hat die Aufgabe, selektiv Endprodukte des Stoffwechsels sowie mit der Nahrung aufgenommene Elektrolyte und Wasser aus dem Blut zu eliminieren.

Die funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron, das aus dem Glomerulus und dem Tubulus besteht. Der Glomerulus wird aus Kapillarschlingen, die aus der afferenten Arteriole, dem Vas afferens, hervorgehen und in das Vas efferens einmünden, sowie aus der Bowmanschen Kapsel gebildet. Der Tubulus besteht aus dem proximalen Tubulus, der Henleschen Schleife, und aus dem distalen Tubulus, welcher in das Sammelrohr mündet.

Bemerkenswerterweise berührt der Anfang des distalen Tubulus den Gefäßpol des Glomerulus der gleichen Nephroneneinheit. An der Kontaktstelle sind die Zellen des Tubulus zu den sogenannten Macula densa-Zellen differenziert. Diese Macula densa-Zellen, sowie Teile der afferenten und efferenten Arteriole zusammen mit den "laci cells" (Goormaghtigh-Zellen) bilden den juxtaglomerulären Apparat (Latta, 1973), (Abb.1).

In der Wand der afferenten, und zum Teil auch der efferenten Arteriole befinden sich Zellen, die sich durch prominente sekretorische Vesikel auszeichnen.

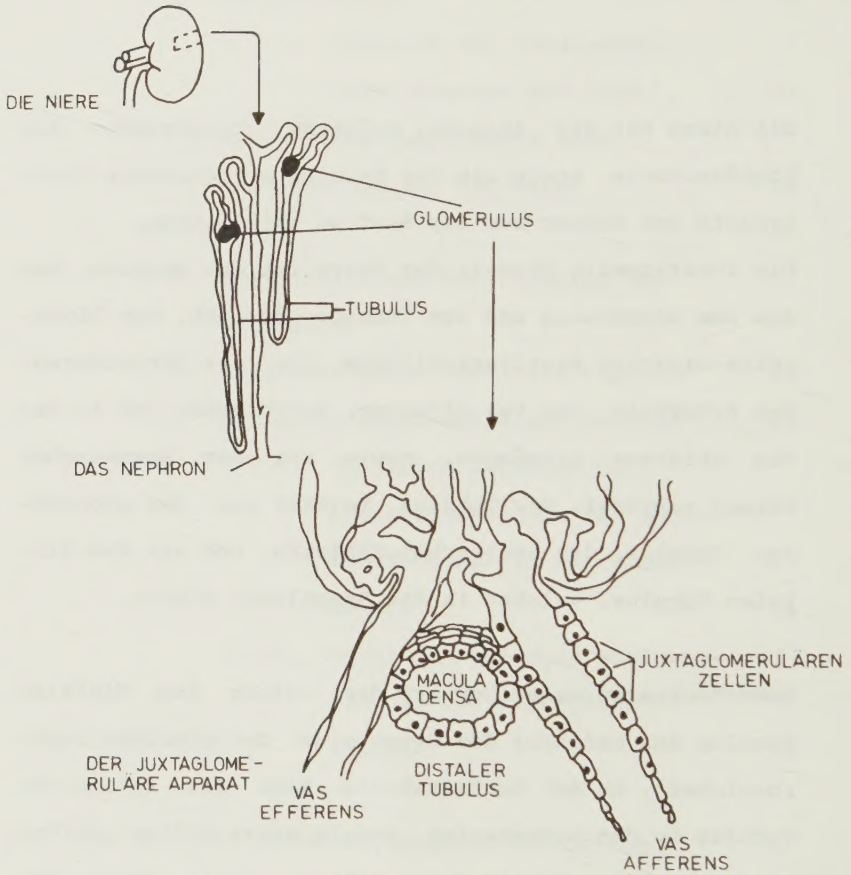


Abb.1: Schematische Darstellung der Niere, des Nephrons und des juxtaglomerulären Apparates

Diese Zellen werden juxtaglomeruläre oder myoepithelioide Zellen genannt (siehe Thureau und Mason, 1974).

Beim Filtrationsprozess, der im Glomerulus stattfindet, werden Proteine und Zellen im Blut zurückgehalten, während das Wasser mit den darin gelösten niedermolekularen Stoffen in den Tubulus gelangt, wo der größte Teil des Filtrats durch einen selektiven Resorptionsprozess der Tubulus-Zellen zurück ins Blut transportiert wird. Der Rest, sowie von den Tubulus-Zellen aus dem Blut in die Tubulusflüssigkeit sezernierte Stoffe, werden mit dem Urin ausgeschieden.

Die Filtrationsrate hängt von der glomerulären Plasmaströmung, dem Blutdruck in den Glomeruluskapillaren und der Filtrationspermeabilität der glomerulären Kapillarwände ab. Die Resorptionsrate wiederum hängt von der Transportfähigkeit der Tubulus-Zellen ab.

Ein Versagen der tubulären Resorptionsfähigkeit oder bereits deren Verminderung bei einer konstant hohen glomerulären Filtrationsrate würde zu Flüssigkeitsverlusten führen, die mit dem Leben unvereinbar wären.

Eine solche Situation wird lokal in der Niere durch einen tubuloglomerulären Feedbackmechanismus verhindert, welcher die Filtrationsrate an die Resorptionsrate an-

paßt und damit unkontrollierte Flüssigkeitsverluste verhindert (Thurau und Boylan, 1976; Thurau et al., 1982).

Die anatomische Basis für einen solchen Rückkoppelungsmechanismus ist der juxtaglomeruläre Apparat, (JGA), (Thurau et al., 1982). Die juxtaglomerulären Zellen und die Zellen der Macula densa liegen in jeder einzelnen Nephroneneinheit direkt nebeneinander, so daß sie einerseits die Zusammensetzung der tubulären Flüssigkeit und dadurch die tubuläre Resorptionsrate wahrnehmen, und andererseits die Blutzufuhr zum Glomerulum und dadurch die Filtrationsrate regulieren können.

Die vasomotorische Komponente des tubuloglomerulären Feedbackmechanismus wird dem im JGA lokalisierten Renin-Angiotensin-System zugeschrieben (Thurau, 1974 a,b).

Das Renin-Angiotensin-System ist ein enzymatisch ablaufendes Kaskadensystem, das mit der Freisetzung des in den juxtaglomerulären Zellen synthetisierten Renins gestartet wird.

Renin ist eine Aspartyl-Protease, die aus dem Angiotensinogen, einem α_1 -Globulin, das Dekapeptid,

Angiotensin I abspaltet. Ein Converting Enzym, wandelt das Angiotensin I in das vasoaktive Oktapeptid Angiotensin II um. Proteolytische Enzyme, sogenannte Angiotensinasen, bauen es schließlich über das Heptapeptid Angiotensin III in inaktive Fragmente ab (Reid et al., 1978; Peach, 1977), (Abb.2).

Der Haupteffektor des Renin-Angiotensin-Systems, das Angiotensin II, zählt zu den am stärksten wirksamen vasokonstriktorisches Substanzen. In pharmakologischen Versuchen ruft es eine Erhöhung des peripheren Widerstandes und damit einen starken Anstieg des arteriellen Blutdruckes hervor. Außerdem bewirkt es in den Nebennieren die Freisetzung von Aldosteron, welches seinerseits in der Niere die tubuläre Natrium-Ionen-Resorption erhöht.

Die lokale Wirkung des Renin-Angiotensin-Systems tritt also zusätzlich zu den Funktionen im Gesamtorganismus auf. Dabei wird eine Veränderung der fröhdistalen Na^+ -Ionen-Konzentration von dem Macula densa-Segment eines Nephrons wahrgenommen und als Signal an die Zellen des JGA im Bereich des Vas afferens weitergeleitet, wo es die lokale Bildung von Angiotensin II bewirkt, das seinerseits die glomeruläre Hemodynamik und damit die

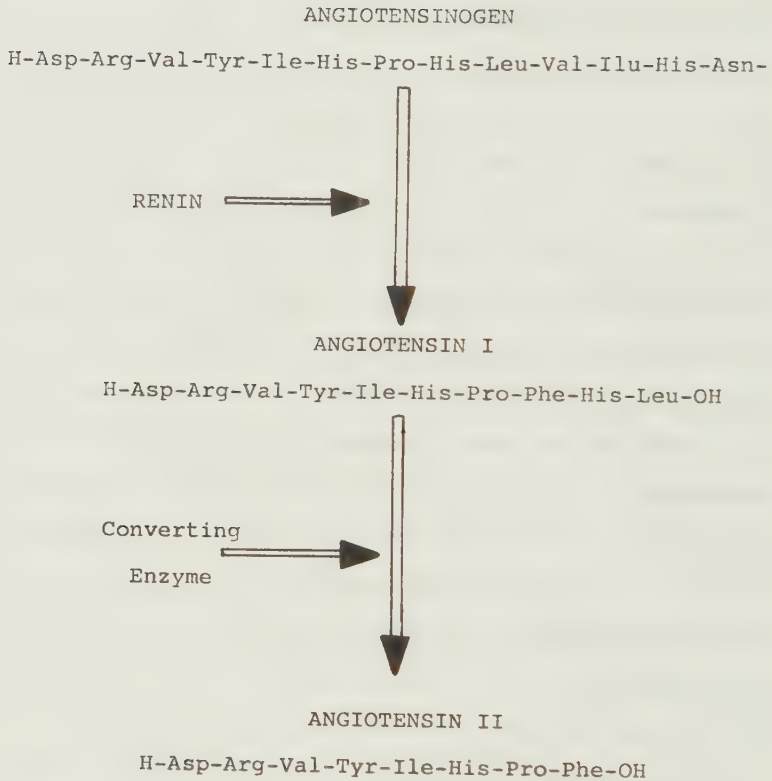


Abb.2. Die Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems.
(Reid et al., 1978).

Filtrationsrate entsprechend ändert (Thurau et al., 1982; Dev et al., 1974; Schnermann und Briggs, 1985).

Der tubuloglomeruläre Feedback-Mechanismus kann schematisierend als ein "Signal-Transmission-Effektor-Effekt" System angesehen werden (Abb. 3).

Das Signal und der Effekt sind mittels Mikropunktions-techniken untersucht worden (Briggs et al., 1982; Francisco et al., 1982; Gilles und Morgan, 1982; Häberle und Davis, 1982, Ploth und Roy, 1982; Schnermann et al., 1976; Thurau et al., 1972; Thurau et al., 1982) indem die Einzelnephron-Filtrationsrate (SNGFR) gemessen und mit der chemischen Zusammensetzung der tubulären Flüssigkeit an der Macula densa korreliert wurde.

Das SNGFR kann durch Bestimmung der frühproximalen Stromstärke gemessen werden (Gertz et al., 1966). Veränderungen der chemischen Zusammensetzung der tubulären Flüssigkeit an der Macula densa werden experimentell durch die Perfusion des Tubulus mit verschiedenen Lösungen simuliert (Schnermann und Briggs, 1985).

Diese Untersuchungen haben gezeigt, daß die SNGFR umgekehrt proportional zu der NaCl-Konzentration an der

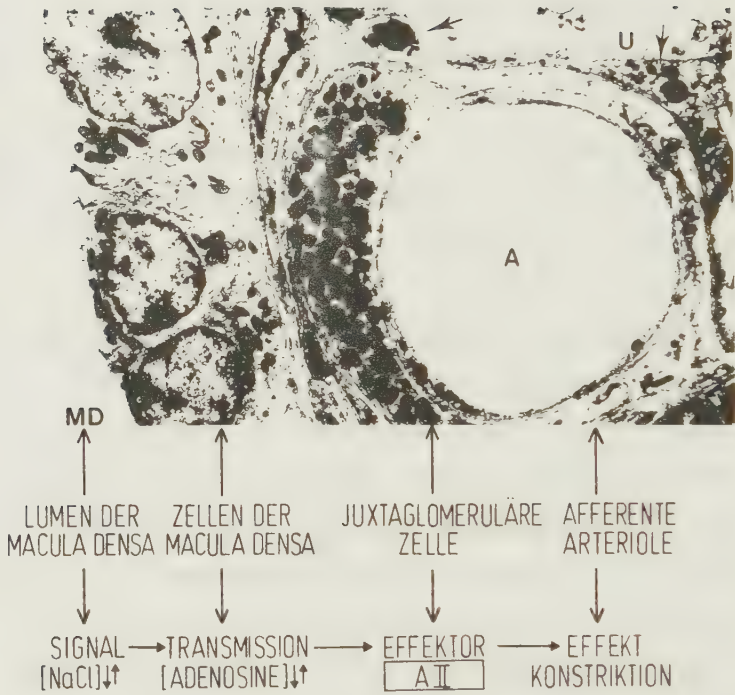


Abb.3. Schematische Darstellung des tubuloglomerulären Feedback-Systems.

Querschnitt der juxtaglomerulären Region einer normalen Ratte, modifiziert aus Ryan, et al., 1982.

Macula densa ist, wobei die NaCl-Konzentration im macula densa-Segment eine Funktion der Stromstärke in der Henle'schen Schleife ist.

Die Möglichkeit, daß die SNGFR durch die Osmolarität oder die Durchflußrate selbst reguliert wird, ist ausgeschlossen worden: Die Perfusion des Tubulus mit Mannitol ergibt keine Änderung der SNGFR (Thurau und Schnermann, 1965; Thurau et al., 1982)

Über die Transmission des Signals von den Macula densa Zellen an die epitheloiden Zellen des juxtaglomerulären Apparates ist wenig bekannt. In einem hypothetischen Modell wird Adenosin als ein mögliches signalübertragendes Molekül vorgeschlagen (Osswald et al., 1982). Andere Möglichkeiten der Signaltransmission beinhalten elektrisches Membranpotential oder die intrazelluläre Cl^- -Ionen-Konzentration.

Über die Wirkungsweise des Effektors ist ebenfalls bisher wenig bekannt. Man nimmt an, daß das in das Interstitium des JGA freigesetzte Renin eine lokale Bildung von Angiotensin II bewirkt, vorausgesetzt, daß Angiotensinogen und das Converting Enzym dort bereits vorhanden sind (Thurau, 1970; Burghardt et al., 1982). Angiotensin II wirkt dann, indem es sich an die Rezep-

toren der juxtaglomerulären Zellen bindet (Sraer. et al., 1974) und dadurch die Kontraktion der Myofibrillen der glatten Muskulatur in Gang setzt, was letztendlich zu einer Änderung der glomerulären Hemodynamik und der Filtrationsrate eines Glomerulus führt (Morgan et al., 1982).

Eine attraktive Alternative zu dem oben beschriebenen Modell der Angiotensin II Wirkung bietet die Hypothese der intrazellulären Bildung und Wirkung von Angiotensin II. Es ist vorgeschlagen worden, daß Angiotensin II intrazellulär gebildet wird und seine Konzentration durch das von der Macula densa kommende Signal reguliert wird. Angiotensin II wirkt dann intrazellulär, wobei die Kontraktion der afferenten Arteriole durch die Wirkung von Angiotensin II auf die intrazellulären Myofibrillen verursacht wird (persönliche Mitteilung Prof. Thurau). Diese Hypothese wäre durch die Demonstration einer direkten Beziehung zwischen der NaCl-Konzentration an der Macula densa und der Aktivität eines, an der intrazellulären Angiotensin II Bildung beteiligten Faktors überprüfbar. Für eine solche Untersuchung ist die Kenntnis des intrazellulären Angiotensin II-Bildungs- und Wirkungsmechanismus unerlässlich.

Das Ziel dieser Arbeit ist, die durch Prof. Thureau erstellte Hypothese der intrazellulären Angiotensin II-Bildung und -Wirkung theoretisch, aufgrund der heute bekannten Informationen über die Komponenten des Renin-Angiotensins-Systems, von der zellulären und molekularbiologischen Seite aus zu prüfen.

Diese Aufgabe wurde mit Hilfe der folgenden drei Fragen angegangen.

1. Werden alle Renin-Angiotensin-System Komponenten in den juxtaglomerulären Zellen synthetisiert?
2. Wenn ja, werden sie in einer nichtsekretorischen Form synthetisiert?
3. Wenn ja, wie wirkt Angiotensin II in den juxtaglomerulären Zellen?

II. LOKALISATION VON ANGIOTENESINOGEN, ANGIOTENSIN I, ANGIOTENSIN II, RENIN UND CONVERTING ENZYME IN DEN JUXTAGLOMERULÄREN ZELLEN.

1. Immunochemische Untersuchungen

Die Hypothese, daß Angiotensin II intrazellulär als Effektor des tubuloglomerulären Feedbacksystemes wirken könnte, wird durch immunochemische Arbeiten gestützt, in denen Angiotensin II oder die an der Angiotensin II Bildung beteiligten Komponenten in den juxtaglomerulären Zellen nachgewiesen wurden.

Die immunochemischen Methoden beruhen auf dem Prinzip der Antigen-Antikörpererkennung mit Hilfe speziell markierter Antikörper (z.B. Gold, Enzym). Dadurch können z.B. in Gewebeschnitten die interessierenden Antigene wie Angiotensinogen oder Renin sichtbar gemacht werden (Elektron-Mikroskopie, Licht-Mikroskopie), (Roith, 1980).

Taugner (Taugner und Hackenthal, 1981; Taugner et al., 1982a,b) und Celio (Celio und Inagami, 1981) haben mit dieser Methode demonstriert, daß Angiotensin II zusammen mit Renin in denselben epitheloiden Zellen der afferenten Arteriole lokalisiert ist. Weitere Arbeiten

haben gezeigt, daß Angiotensin II nicht nur in denselben Zellen wie Renin, sondern sogar in denselben sekretorischen Vesikeln wie Renin vorkommt (Taugner et al, 1984), (Abb.4). Angiotensinogen, Angiotensin I und Converting Enzym konnten in den juxtaglomerulären Zellen nicht nachgewiesen werden. Die Autoren vermuten daher, daß Angiotensin II nicht in den juxtaglomerulären Zellen gebildet wird, sondern durch Endozytose in das Zellinnere gelangt.

Die Frage, ob Angiotensin II tatsächlich durch Endozytose in die juxtaglomerulären Zellen aufgenommen wird, oder ob es zusätzlich zu seinem gut bekannten extrazellulären Entstehungsmechanismus intrazellulär gebildet werden kann, wurde durch Rightsel (Rightsel et al., 1982) an Zellkulturen untersucht.

Diese Untersuchung wurde an der einer Einzelzelle entstammenden Zellkultur durchgeführt, um auszuschließen, daß Angiotensin II aus dem Blut oder dem benachbarten Gewebe in das Zellinnere gelangen könnte, und somit die Resultate verfälscht. Die verwendeten epitheloiden Zellen, die der Nierenrinde einer Ratte entstammten, wurden mit den heute weitgehend standardisierten Methoden gezüchtet.

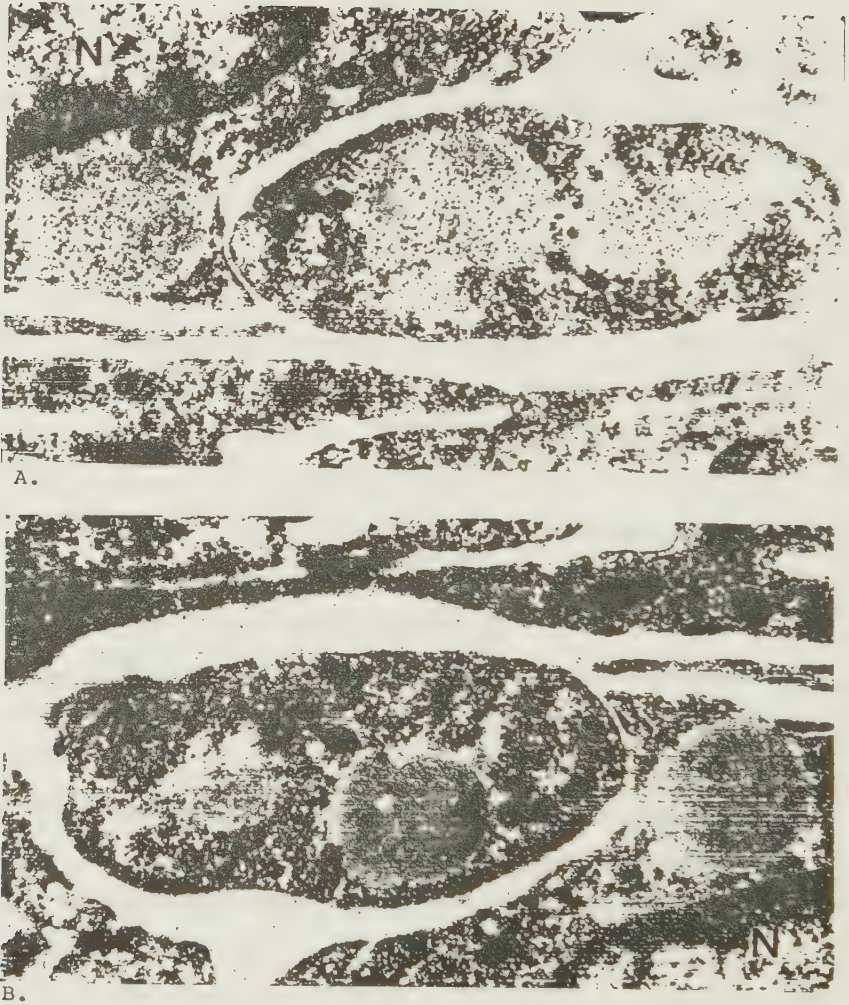


Abb.4: Die juxtaglomeruläre Zelle einer normalen Ratte.

A. Inkubiert mit Renin-Antiserum.

B. Inkubiert mit Angiotensin II Antiserum.

(Taugner et al,1984)

Die Identität der gezüchteten Zellen wurde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt. Sie wiesen die für die juxtaglomerulären Zellen charakteristischen Strukturmerkmale auf: ein ausgeprägtes endoplasmatisches Retikulum, Golgi Apparat, sekretorische Vesikel und an "periphere bodies" angehängte Myofibrillen. Der Karyotyp dieser Zellen war normal.

Die Renin-Aktivität wurde durch die in einer standardisierten Angiotensinogen-Probe gebildete Angiotensin I-Menge bestimmt, während Converting Enzym Aktivität mit einem synthetischen Substrat (Hippuryl-His-Leu) bestimmt wurde (De Pierre und Poth, 1975). Angiotensin I und Angiotensin II-Mengen wurden mit dem Radioimmunoassay bestimmt (Haber et al, 1969; Gocke et al, 1968). Um eine Kontamination durch Angiotensin II im Inkubationsmedium zu verhindern, hat der Autor die Zellen so lange gewaschen, bis die abwaschbare Renin- Aktivität minimal wurde, und sie zudem 24 Stunden vor dem Ernten in serumfreiem Medium kultiviert. Die geernteten Zellen wurden dann durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen sowie durch Behandlung mit Detergenzien aufgeschlossen und auf Renin, Converting Enzym, Angiotensin I und Angiotensin II-Gehalt untersucht.

Außer Angiotensinogen konnten dergestalt alle Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems nachgewiesen werden.

Die Zell-Kulturen , die bis zur Ernte in einem serumhaltigen Medium gezüchtet wurden, zeigten eine dreibis viermal niedrigere Renin-, Angiotensin I- und Angiotensin II-Konzentration.

Diese Resultate sind ein sehr starker Hinweis darauf, daß Angiotensin II intrazellulär gebildet werden kann. Der Ursprung von Angiotensinogen bleibt jedoch umstritten. Es ist möglich, daß die juxtaglomerulären Zellen das Angiotensinogen aus dem Serum internalisiert haben, doch die Tatsache, daß die Angiotensin I- und II-Mengen nach Serumentzug gestiegen sind, deutet auf einen endogenen, intrazellulären Ursprung des Angiotensinogens. Die Frage der intrazellulären Angiotensin II- Bildung wurde auch von Okamura (Okamura et al., 1981) an Neuroblastomazellen der Ratte und der Maus untersucht. Die Züchtung der Zellkulturen , die Meßmethoden und die Ergebnisse sind mit den von Rightsel vergleichbar und unterstützen die Hypothese, daß Angiotensin II durch einen intrazellulären Mechanismus gebildet wird.

Die bei diesen Untersuchungen angewandten immunozytochemischen Methoden sind insoweit limitierend, als sie zwar die Anwesenheit eines Proteines in der Zelle de-

monstrieren können, nicht aber die Fähigkeit der Zelle, dieses auch zu synthetisieren. Daher lassen die oben zitierten Untersuchungen die Möglichkeit offen, daß Angiotensinogen doch aus dem Serum durch Endozytose in die untersuchten Zellen eingeschleust wurde, und nicht in diesen ihren Ursprung hat.

2. Histo-hybridisierung

Die Fähigkeit einer Zelle, ein bestimmtes Protein zu synthetisieren, muß neben der direkten Identifizierung des Proteines, durch Identifizierung der entsprechenden mRNA in der fraglichen Zelle bewiesen werden.

Die in den letzten Jahren entwickelte Methode eine DNA herzustellen, die der mRNA komplementär ist (cDNA), hat es ermöglicht, in einem heterogenem RNA-Gemisch eine bestimmte mRNA zu identifizieren.

Die Technik, eine bestimmte mRNA zu identifizieren, beruht auf dem Prinzip, daß zwei komplementäre DNA bzw. RNA-Stränge eine Doppelhelix bzw. ein Hetero-Duplex bilden, die bei der Denaturierung getrennt und bei der Renaturierung wieder reassoziert werden. Will man in

einem heterogenen mRNA-Gemisch eine bestimmte mRNA identifizieren, so muß man diese mRNA in einer komplementären cDNA-Form zur Verfügung haben. Die cDNA wird radioaktiv markiert und dem heterogenen RNA-Gemisch als sog. Sonde unter renaturierenden Bedingungen dazugegeben. Während der Renaturierung werden die komplementären Stränge, darunter auch die markierte cDNA, reasoziiert und die gesuchte mRNA kann durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

Die Hybridisierungsmethode hat eine breite Anwendung bei der Identifizierung verschiedener mRNA-Populationen gefunden (Alwine et al., 1977; Gillespie und Spiegelman, 1965; Grundstein und Hogness, 1975; Noyes und Stark, 1975; Southern, 1975).

Eine davon ist die Histo-hybridisierung, die es ermöglicht, eine spezifische mRNA-Population in einem Gewebeschnitt nachzuweisen. Das Prinzip der Histo-hybridisierung besteht darin, daß man sorgfältig präparierte Gewebeschnitte zusammen mit einer radioaktiv markierten cDNA inkubiert und die Schnitte anschließend wäscht und trocknet. Mit der Autoradiographie werden diejenigen Zellen sichtbar gemacht, die die cDNA gebunden haben und demzufolge auch die gesuchte mRNA enthalten (Coghlan et al., 1984; Brahic und Haase, 1978; Harrison et al., 1983; Hudson et al., 1981)

Mit der Methode der Histo-hybridisierung haben Darby und seine Kollegen (Darby et al., 1985) am Institut für Experimentelle Physiologie und Medizin in Melbourne das Vorkommen und die Lokalisierung der Renin-mRNA in dem ovinen renalen Cortex untersucht.

Die Abbildungen der Nierenschnitte, die mit Renin-mRNA inkubiert wurden, zeigen eine Silberkörner-Verteilung, der zu entnehmen ist, daß eine starke Hybridisierung in den Zellen der Wand der afferenten Arteriole am vaskulären Pol des Glomerulus stattgefunden hat (Abb.5a). Weiterhin deutet die Verteilung der Silberkörner auf eine Hybridisierung entlang der afferenten Arteriole hin (Abb.5b). Sowohl die Zellen der kortikalen Arteriole als auch die Zellen der intralobularen Arterien zeigen Renin-mRNA Synthese. (Abb.5c,d).

Dieselben Nierenschnitte wurden zur Kontrolle mit der Ovalbumin-cDNA hybridisiert und haben dabei eine andere Silberkörnerverteilung gezeigt. Die Renin cDNA hat in den Leberschnitten keine Renin-mRNA-Synthese aufgezeigt, während sie in Schnitten aus der Niere und aus der submaxillaren Drüse der Maus hybridisiert hat (Darby et al, 1985).

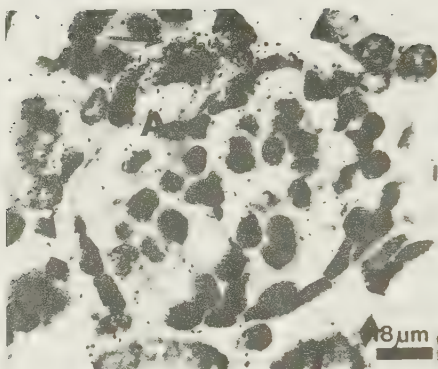


Abb.5a: Querschnitt des Glomerulus. Zellen der medialen Schicht zeigen Renin-Gen-Expression.

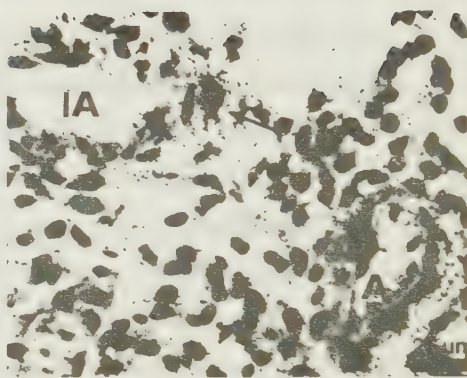


Abb.5c: Querschnitt der interlobulären Arterie (IA) und der kortikalen Arterie. Mediale Schicht der beiden Strukturen zeigt Renin-Gen-Expression.

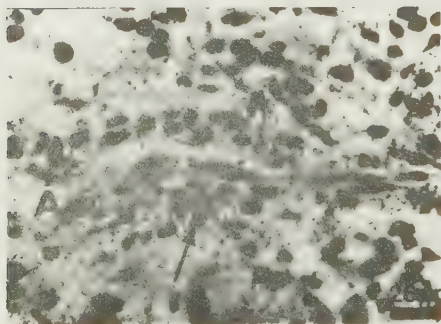


Abb.5b: Querschnitt der Afferenten Arteriole. Zellen der glatten Muskel-Schicht zeigen die Renin-Gen-Expression.

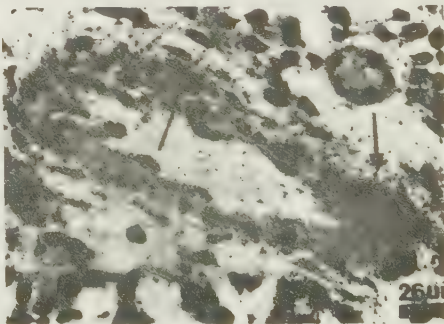


Abb.5c: Querschnitt der interlobulären Arterie der renalen Cortex. Zwei Zell-Gruppen der medialen Schicht zeigen die Renin-Gen-Expression.

Abb.5: Die renale Cortex-Region eines Schafes inkubiert mit Renin-mRNA (Darby et al., 1985).

Die Arbeit von Darby zeigt, daß eine Histo-hybridisierung reproduzierbare und leicht interpretierbare Ergebnisse liefern kann.

Eine Hybridisierung der Renin- und Angiotensinogen-mRNA mit den Gewebeschnitten aus der juxtaglomerulären Region könnte wesentlich zur Klärung der Frage der intrazellulären Angiotensin II Bildung beitragen.

Die Methode der Histo-hybridisierung hat aber auch ihre Probleme und Limitierung. Die Wahl des Fixierungsmittels, Grad der Proteolyse, Vorbereitung der cDNA Sonde und die Inkubationszeit können die Ergebnisse einer Histo-hybridisierung bedeutend beeinflussen. Eine aufschlußreiche, vergleichende Untersuchung dieser Parameter wurde durch Lawrence und Singer durchgeführt (Lawrence und Singer, 1985).

Die Eignung der Fixierungsmittel (Glutaraldehyde, Äthanol/Essigsäure, 4% Paraformaldehyde und Carnoy's Lösung) wurde durch einen Vergleich des Hybridisierungsgrades der verschiedenen fixierten Zellen ermittelt, wobei die nicht spezifische Hybridisierung mit der Hybridisierung der pBR322 DNA gemessen wurde.

Es zeigte sich, daß die Fixierung in Paraformaldehyd zu einer erheblich stärkeren Hybridisierung und besseren Retention der gesamten RNA führt als eine Fixierung in Äthanol/Essigsäure. Die Verwendung von Äthanol/Essigsäure oder Carnoy's Lösung führt zu einem Verlust von mehr als 75% der gesamten zellulären RNA. Der Hybridisierungsgrad der mit Glutaraldehyd fixierten Zellen ist um 60-70% kleiner als der mit Paraformaldehyd behandelten Zellen. Außerdem zeigen die Glutaraldehyd fixierten Zellen neben der verminderten Hybridisierung eine erhöhte, nicht spezifische Hybridisierung mit der pBR322 cDNA. Die verminderte Hybridisierung der Glutaraldehyd fixierten Zellen ist nicht durch einen Verlust an gesamter RNA zu erklären, wie es bei der Äthanol/Essigsäure Fixierung der Fall ist, sondern durch die noch intakten Zellstrukturen, die den Zugang der Probe und das Auswaschen des nicht gebundenen Anteils erschweren.

Obwohl Äthanol/Essigsäure, Glutaraldehyde, und Carnoy's Lösung meist als Fixierungsmittel bei den Histo-hybridisierungen eingesetzt werden, läßt sich aus den Untersuchungen ersehen, daß sie nicht optimal dafür geeignet sind.

Der auf die Fixierung folgende Schritt der proteolytischen Verdauung ist besonders kritisch. Ein partiel-

ler Abbau der Zellproteine erleichtert den Zugang der Sonde zu der mRNA. Die Struktur der Zelle soll dabei nicht beeinträchtigt werden. Die optimalen Reaktionsbedingungen für die proteolytische Verdauung eines Gewebeschnittes müssen in Abhängigkeit von der Gewebeart, dem Fixierungsmittel und der verwendeten Protease für jeden Hybridisierungsansatz herausgefunden werden. Die Untersuchung der verschiedenen Proteasen hat ergeben, daß Pronase und Protease K am besten für diesen Schritt geeignet sind.

Die bei der Verwendung des Glutaraldehydes auftretende weitgehende Retention der gesamten RNA ist auf eine Quervernetzung der Matrix zurückzuführen, die den Zugang zu der Probe erschwert. Eine proteolytische Behandlung resultiert in einem erhöhten Hybridisierungsgrad, der immer noch niedriger als in Paraformaldehyd fixierten und nicht proteolytisch behandelten Zellen ist, wobei die unspezifische Hybridisierung mit dem pBR322 im ersten Fall höher ist als im zweiten. Eine proteolytische Behandlung der Paraformaldehyd fixierten Zellen trägt dagegen nicht zu der Hybridisierung bei: dagegen hat eine Inkubation der Zellen mit Protease K einen Verlust der mRNA von mehr als 50% zur Folge. Die Paraformaldehyd-Fixierung ist vorteilhaft nicht nur weil es eine hohe Hybridisierung während der RNA-Prä-

servation ermöglicht, sondern weil es eine proteolytische Behandlung nicht erfordert, die selbst, mehr oder weniger, zu einer Veränderung der zellulären Strukturen führt.

Bei der Vorbereitung der cDNA-Sonde spielt die Länge, der Grad der Homologie mit der Ziel-Sequenz, sowie die Wahl der Markierung eine Rolle.

Einige Hybridisierung-Experimente (Gerhard et al., 1981) weisen darauf hin, daß das Einsetzen einer langen cDNA-Sonde die Effizienz der Hybridisierung steigert, während Ergebnisse anderer Arbeiten darauf hindeuten, daß kurze cDNA-Fragmente besser für eine Hybridisierung geeignet sind (Angerer und Angerer, 1981 ; Brahic und Haase, 1978). Die Untersuchung vom Lawrence und Singer zeigt jedoch, daß mit unterschiedlich langen cDNA-Sonden (50-1000bp) keine signifikante Änderung der Hybridisierung-Effizienz erfolgt.

Bei der Vorbereitung einer cDNA-Sonde muß darauf geachtet werden, daß diese nur aus den mRNA homologen Sequenzen besteht, und nicht die von Klonierung übriggebliebenen plasmid oder dA.dT-Sequenzen beinhaltet. Die Markierung einer cDNA mit ^{32}P hat den Vorteil der Schnelligkeit und der Einfachheit. Die von dem ^{32}P emittierte Strahlung kann schon nach wenigen Stunden

auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden. Die Markierung mit ^3H oder ^{125}J erfordert dagegen eine Exposition von 1-9 Monaten. Die kurze Entwicklungsdauer ist im Anfangsstadium einer Untersuchung von einer besonderen Bedeutung, weil nur so allfällige Modifikationen und Optimierungen der Methode in einem vernünftigen Zeitraum durchgeführt werden können. Obwohl Hybridisierung mit einer ^3H oder ^{125}J markierten cDNA eine deutlichere Auflösung ergibt, erfaßt man mit ^{32}P Markierung ebenfalls den subzellulären Bereich (Bloch et al., 1984).

Die Dauer der Inkubation der cDNA mit den Gewebeschnitten bei den behandelten Histo-hybridisierungen beträgt meistens 1-4 Tage. Kinetische Untersuchungen von Lawrence und Singer (Lawrence und Singer, 1985) zeigen jedoch, daß die Hybridisierungsreaktion rapide ansteigt und ihr Maximum bereits nach 3-4 Stunden erreicht. Danach ablaufende Reaktionen zeigen ein verschiedenes Verhalten. In manchen Experimenten bleibt der maximal erreichte Hybridisierungsgrad 2 Tage lang erhalten. In anderen Experimenten dagegen nahm das Hybridisierungssignal im Laufe von 2 Tagen um 50% ab.

Die Ursache für die verminderte Signalstärke konnte durch den allgemeinen Verlust der RNA erklärt werden,

der bei manchen Ansätzen beobachtet wurde. Darüber hinaus steigt mit fortschreitender Inkubationszeit die unspezifische Hybridisierung an, wie durch Inkubation der Gewebsschnitte mit der pBR322 ermittelt wurde.

Histohybridisierung kann nicht nur zum Nachweis einer spezifischen mRNA-Population sondern auch zu ihrer Quantifizierung eingesetzt werden. Messungen der mRNA-Konzentrationen in einem Organ oder in einer Zelle während der Hormon-Induktion oder während des Wachstums sind bereits mit Hilfe der Hybridisierungstechniken vorgenommen worden (Roop et al., 1978; Beach und Palmiter, 1981).

Eine Quantifizierung der Renin-mRNA oder der Angiotensinogen-mRNA bei einem Zustand erhöhter NaCl-Konzentration in der Macula densa würde Aufschluß darüber geben, ob die Regulation des Renin-Angiotensin-Systems im Rahmen des tubuloglomerulären Feedbacksystems bereits auf der DNA-Ebene erfolgt.

Converting Enzym-mRNA müßte zuerst isoliert und kloniert werden, um für diese Untersuchung als cDNA zur Verfügung zu stehen.

III. RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEM-KOMPONENTEN ALS NICHT SEKRETORISCHE PROTEINE.

Die im Kapitel II besprochenen Arbeiten deuten stark darauf hin, daß Angiotensinogen, Renin und Converting Enzym intrazellulär synthetisiert werden könnten. Angenommen, daß tatsächlich alle Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems in den juxtaglomerulären Zellen synthetisiert werden, dann stellt sich die Frage, wie diese Proteine, die normalerweise den Bildungsweg von sekretorischen Proteinen durchlaufen, in der Zelle verbleiben können.

Die inzwischen bekannten (von den Nukleotidsequenzen abgeleiteten) Aminosäuresequenzen von Renin und Angiotensinogen zeigen, daß diese zwei Proteine in einer sekretorischen Form synthetisiert werden. Das bedeutet, daß sie am aminoterminalen Ende um 20 resp. 33 Aminosäuren länger sind als ihre fertige Polypeptidkette. Diese zusätzliche Aminosäuresequenz, Signalsequenz genannt, ist reich an hydrophoben Aminosäuren und lagert sich deswegen bevorzugt an Membranbindungsorten an. Da der aminoterminal Abschnitt zuerst fertiggestellt wird, kann der Polysomenkomplex mit der noch wachsenden Polypeptidkette Kontakt mit den Stellen auf der Membran des endoplasmatischen Retikulums aufnehmen.

Man vermutet, daß der Kontakt mit dem Signalpeptid die Bildung von Kanälen in der Membran induziert, durch die dann das Protein hindurch transportiert wird. Während des Durchtritts trennt eine Peptidase das Signalpeptid ab. Nach Fertigstellung der Proteinkette und Ablösung des Ribosoms von der mRNA schließt sich der Kanal wieder (Abb.6).

Im Innenraum des Endoplasmatischen Retikulums wird normalerweise durch spezielle Enzyme jedem neusynthetisierten glykosylierten Protein das gleiche, aus 14 Zucker-Einheiten bestehende Oligosacharid-Molekül angeheftet. Als Glykoproteine kommen sie dann in Vesikel verpackt zum Golgi-Apparat.

Alle für die Lysosomen bestimmten Proteine werden im Golgi-Apparat als solche erkannt und erhalten Phosphat-Reste an ihre Zuckerseitenketten. Das phosphatübertragende Enzym erkennt die lysosomalen Proteine an bislang unbekannten charakteristischen Strukturmerkmalen. Die phosphattragenden Proteine werden dann von einem für Phosphatreste spezifischen Rezeptorsystem eingefangen und in Vesikel verpackt, die schließlich mit den Lysosomen fusionieren.

Die Oligo-Sacharid-Ketten bei sekretorischen Proteinen und Plasmamembranproteinen werden hingegen typischerweise viel stärker modifiziert. Diese Proteine wer-



Das Ribosom initiiert die Protein-Synthese auf einer freien mRNA.



Das Signalpeptid verursacht Anheftung des Ribosoms an die Membran.



Das Protein durchquert die Membran; während die Translation weiter stattfindet, wird das Signalpeptid abgespalten.



Das Protein hat die Membran durchquert.

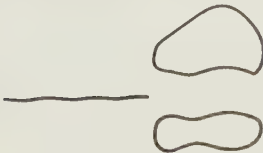


Abb.6. Sekretionsweg eines Proteins, (Levin, 1983)

den dann in die Plasmamembran eingebaut oder in sekretorische Vesikel verpackt, die schließlich ihren Inhalt nach außen entleeren, (Rothman,1985), (Abb.7).

Sollte Angiotensin II zusätzlich zu seinem gut bekannten extrazellulären Entstehungsweg intrazellulär gebildet werden, dann müßten Angiotensinogen, Renin und Converting Enzym, zusätzlich zu ihren sekretorischen Formen, in nichtsekretorischen Formen synthetisiert werden: entweder ohne das Signalpeptid, oder mit dem Signalpeptid, dafür aber mit einer Oligosacharid-Modifizierung, durch die sie im Golgi-Apparat in ein nichtsekretorisches Vesikel, ein Lysosom, verpackt werden. Durch eine genaue Analyse der Genstruktur, des Transkriptions- und Translationsprozesses sowie der Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Angiotensinogens und Renins wird die Möglichkeit überprüft, ob Angiotensinogen und Renin alternativ zu ihren sekretorischen Formen auch als nichtsekretorische Proteine synthetisiert werden.

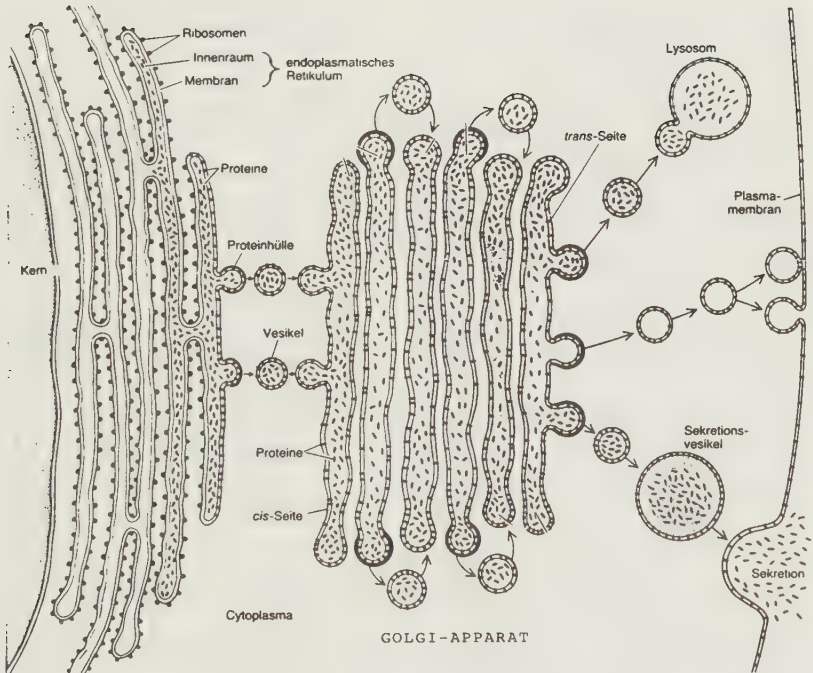


Abb.7: Sortierung der Proteine im Golgi-Apparat.
(Rothman, 1985).

1. Renin

1.1. Genstruktur

Ein typisches eukaryontisches Gen besteht aus der 5'-untranslatierten Region, der kodierenden Region, die durch sogenannte Introns unterbrochen sein kann, sowie der 3'-untranslatierten Region. Die durch die RNA-Polymerase II katalysierte Transkription beginnt mit dem 5'-untranslatierten Bereich und produziert zunächst ein kolineares Transkript, das kodierende und nichtkodierende Sequenzen einschließt, um schließlich in der 3'-untranslatierten Region terminiert zu werden.

Aus dem primären Transkript, das am 3'-Ende einen Poly-A Schwanz enthält, werden anschließend im sogenannten Spleiß-Prozeß die nichtkodierenden Bereiche (Introns) entfernt, wodurch die aktive mRNA entsteht. Die durch die aktive mRNA kodierte Ribonukleotidsequenz wird in einem komplizierten Translationsprozeß durch die Ribosomen in das Protein übersetzt (Abb.8).

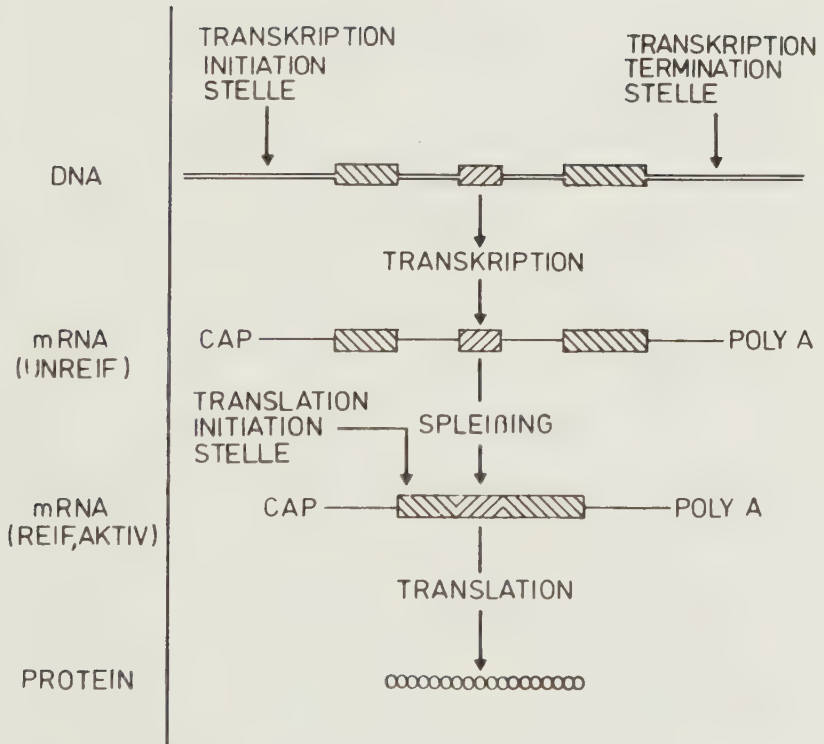


Abb.8: Synthese-Weg eines Proteins .

1.1.1. Struktur des Renin-Gens beim Menschen.

Die Struktur und die Nukleotidsequenz des menschlichen Renin-Gens wurde fast gleichzeitig 1984 von zwei Gruppen identifiziert.

Hobart und seine Kollegen haben in dem menschlichen Renin-Gen neun Exons, die durch acht Introns unterbrochen werden, gefunden. Die Exons sind 98, 151, 119, 197, 120, 142, 99, 150 Basenpaare (bp) lang, die Introns 400, 60, 60, 240, 30, 20, 60 bp (Hobart et al, 1984), 1984), (Abb.10).

Miyazaki und seine Mitarbeiter haben zusätzlich im Intron E ein ungewöhnlich kleines, aus neun Nukleotiden bestehendes Exon identifiziert (Miyazaki et al, 1984). Erstaunlicherweise kodiert dieses Exon fast genau drei im Renin der Maus fehlende Aminosäuren. Da das menschliche Renin durch ein einziges, auf dem Chromosom 1 lokalisiertes Gen kodiert wird (Chirgwin et al., 1984), ist anzunehmen, daß das Vorhandensein der zusätzlichen Aminosäuren auf einen Sequenzpolymorphismus zurückzuführen ist. Ein Sequenzpolymorphismus führt zur Synthese von zwei Proteinen, die sich in der primären Struktur geringfügig unterscheiden, in ihrer katalytischen Funktion jedoch völlig identisch sind.

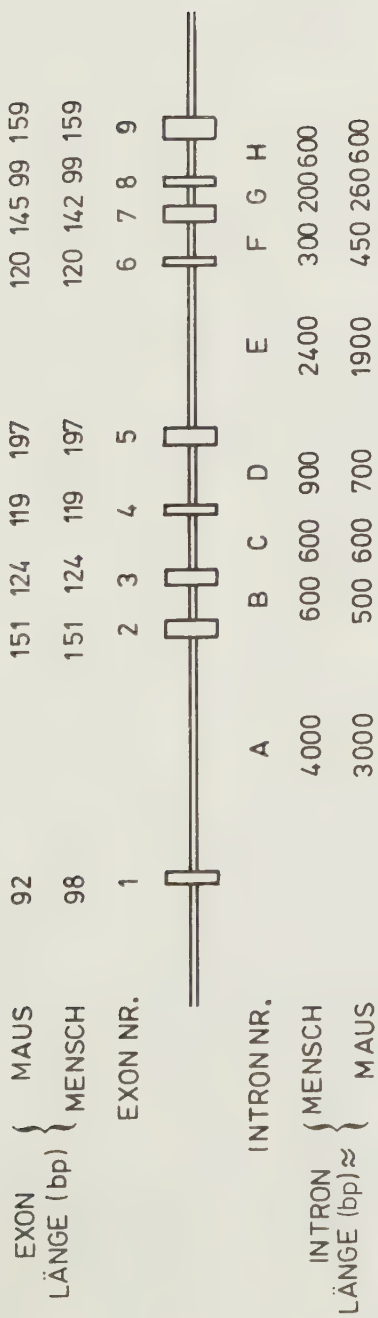


Abb. 10: Organisation der Renin-Genen bei Mensch (Hobart et al., 1984) und Maus (Holm et al., 1984).

1.1.2. Struktur des Renin-Gens bei der Maus

Bei der Maus wird das renale Renin durch das sogenannte Ren1-Gen kodiert, dessen Nukleotidsequenz und Struktur von Holm und seinen Mitarbeitern aufgeklärt wurde, (Holm et al., 1984).

Zusätzlich zu diesem, für das klassische Renin kodierende Ren1-Gen, besitzen manche Mäusestämme ein zweites, für Renin kodierendes Gen, das sogenannte Ren2-Gen, das nur in der submandibulären Drüse exprimiert wird (Panthier et al., 1984).

Das Ren1-Gen erstreckt sich über 9.6 kbp und besteht, wie das menschliche Renin-Gen, aus neun Exons, die durch acht Intronsequenzen unterbrochen werden. Die Exons sind 91, 151, 124, 119, 197, 120, 145, 100 und 341 bp lang, (Holm et al., 1984), (Abb.10).

Obwohl die Struktur des Ren2-Gens noch nicht identifiziert wurde, lassen die Restriktions- und die Heteroduplex-Analyse vermuten, daß es eine ähnliche Intron-Exon-Organisation wie das Ren1-Gen aufweist, (Mullins et al., 1982).

1.1.3. Struktur des Pepsinogen-Gens

Die Strukturen des Renin-Gens des Menschen und der Maus sind der Struktur des Pepsinogen-Genes auffallend ähnlich. Das Pepsinogen-Gen besteht, wie das Renin-Gen, aus neun Exons, die durch acht Introns unterbrochen werden (Sogawa et al., 1983), (Abb.11).

Die Größen der entsprechenden Exons und die Positionen der Introns sind in den beiden Genen fast kongruent. Aufgrund dieser und anderer Ähnlichkeiten glaubt man, daß das Renin zu der Familie der Asparatyl-Proteasen (Chymotrypsin, Cathepsin D) gehört.

1.2. Gentranskription

Die Initiation der Transkription ist ein sehr wichtiger Schritt, durch den die Syntheserate eines Proteins reguliert werden kann. Oft ist es der primäre, manchmal der einzige Schritt, bei dem die Entscheidung, ob ein Gen exprimiert werden soll, getroffen wird.

Ein wichtiger Faktor, der die Häufigkeit der Initiationen reguliert, ist die Affinität der RNA-Polymerase zu zwei Sequenzen, Promotoren genannt, die sich stromaufwärts des exprimierten Gens befinden.

Eine AT-reiche Sequenz, TATA oder Hogness-Box genannt,

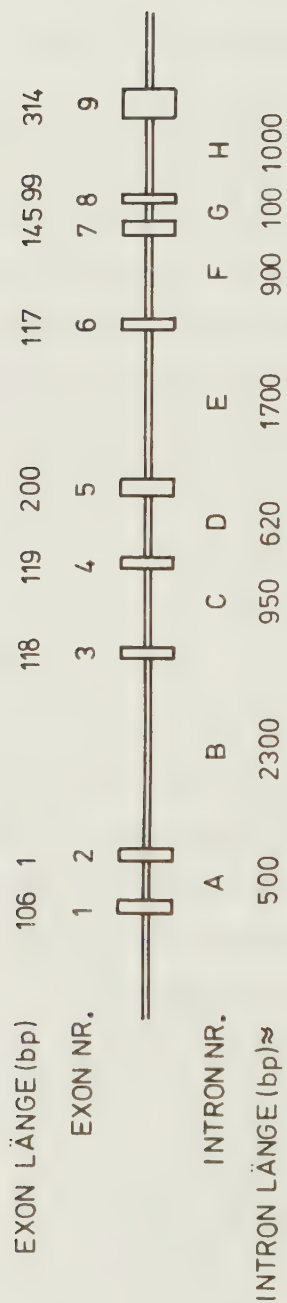


Abb. 11: Organisation des Pepsinogen - Genes bei Mensch
(Sogawa et al., 1983).

befindet sich meistens 25bp stromaufwärts der Transkription-Initiation-Stelle. Man nimmt an, daß sie eine Erkennungs-Funktion für die RNA-Polymerase ausübt.

Die andere Promotor-Sequenz, die meistens 70-80 bp stromaufwärts der Transkription-Initiation-Stelle zu finden ist und CAAT-Box genannt wird, hat vermutlich eine RNA-Polymerase bindende Funktion.

Die genaue Funktion der Promotoren ist noch nicht endgültig aufgeklärt. Bei manchen Genen wurde eine RNA-Polymerase Aktivität beobachtet, obwohl keine Promotoren identifiziert werden konnten (Dierks et al., 1983).

1.2.1. Renin-Gen-Transkription beim Menschen

Die Transkription des Renin-Genes beim Menschen steht unter der Kontrolle von zwei Promotoren. Die Hogness-Box wurde 24bp und die CAAT-Box 46bp stromaufwärts der Transkription-Initiation-Stelle identifiziert (Abb.12a, b). Durch weitere Untersuchungen der für die Genregulation wichtigen 5'-Region des Renin-Genes wurde eine Sequenz an der -450 Stelle gefunden, von der man annimmt, daß sie auch eine regulatorische Funktion hat (Abb.12b). Die Sequenz TGTCT ist als Bindungsstelle für die glukokortikoiden Hormone vorgeschlagen worden,

GGGCAGAGCAGAATCGCAATCACCCCATGCATGGAGCTATAAAAGGGGAAGGGCTAAGGGAGCCA//CAG

AACCTCAGTGGATCTCAGAGAGAGCCCCAGACTGAGGGAAGC ATG GAT GCA TGG AGA AGG ATG
-50

CCT CGC TGG GGA CTG CTG CTG CTC TGG GGC TCC TGT ACC TTT GGT CTC CCG
-34

ACA GAC ACC ACC ACC TTT AAA CG GTAATTGGTAAC:::(4.0kb):::ACAAGAAGTAACTC

-33 -30 ∞

GACAGCACTTTTCTATTTTTGCTTCCTCCACCCTGGGCCAG TGC TTC CTC AAG AGA ATG CCC
 -20 -10

TCA ATC CGA GAA AGC CTG AAG GAA CGA GGT GTG GAC ATG GCC AGG CTT GGT CCC
-1 1 10

GAG TGG ACC CAA CCC ATG AAG AGC CTG ACA CTT GGC AAC ACC ACC TCC TCC GTG
17 18

ATC CTC ACC AAC TAC ATG GAC GTGAGTGCCTGG:: (0.6kb):: TTACCCCCACAG ACC
20 30

CAG TAC TAT GGC GAG ATT GGC ATC GGC ACC CCA CCC CAG ACC TTC AAA GTC GTC
40 50

TTT GAC ACT GGT TCG TCC AAT GTT TGG GTG CCC TCC TCC AAG TGC AGC GGT CTC
58 59 60

TAC ACT CCC TGTG GTGACACCTAAG:::(0.6kb)::TCCCCCTGCCAG TC TAT CAC AAG
70 80
Leu Phe Arg Ala Ser Arg Ser Ser Ser Thr Ileu Val Arg Gly Thr Gly Leu Thr

CTC TTC GAT GCT TCG GAT TCC TCC AGC TAC AAG CAC AAT GCA ACA GAA CTC ACC 98
Leu Arg Tyr Ser Thr Gly Thr Val Ser Gly Phe Leu Ser Gln Asp Ile Ile Thr

99 100
Val Gly Gly Ile Thr Val Thr Gly

Met Phe Gly Glu Val Thr Glu Met Pro Ala Leu Pro Phe Met Leu Ala Glu Phe

Asp Gly Val Val Gly Met Gly Phe Ile Glu Gln Ala Ile Gly Arg Val Thr Pro

ATC TTC GAC AAC ATC ATC TCC CAA GCG CTC CTA AAA GAG GAG CTC TTC TCT TTC

TAC TAC AAC AG GTGGGGACTGGG::(2.4kb)::TCCCCCTGCCAG GAAT TCC CAA TCG
170 180

CTG GGA GGA CAG ATT GTG CTG GGA GGC AGC CAC CCC CAG CAT TAC GAA CCG AAT
190 200 204

TTC CAC TAT ATC AAC CTC ATC AAG ACT GGT GTC TGG CAG ATT CAA ATG AAG CCG

220 230

CTC TGT GAA GAC GGC TGC CTG GCA TTG GTA GAC ACC GGT GCA TCC TAC ATC TCA
240

GGT TCT ACC AGC TCC ATA GAG AAG CTC ATC GAG GCC TTG GGA GCC AAC AAG ACG
250 251 252

CTG TTT GAT GTAACAAAGCCAAA:: (0.2kb):: CCCCCACCCCAG TAT GTC GTC AAG TGT
260 270

AAC GAG GGC CCT ACA CTC GCC GAC ATC TCT TTC CAC CTG GGA GGC AAA GAA TAC
280 284

ACC CTC ACC AGC GCG GAC TAT GTA TTT CAG GTGAGCTTCGAG:: (0.6kb):: CCTTCC
285 290 300

310

GAT ATC CCG CCA CGC ACT GGA CCC ACC TGG GGC CTC GAG GCC AEC TTC ATC CGA
320 330

Ileu Phe Tyr Thr Glu Pro Val Arg Arg Arg Arg Arg Arg Ileu Gly Phe Ala Leu Ala

337
Arg OP

[illegible]

HEALTHCARE COSTS IN THE UNITED STATES

Abb.12a: Nukleotidsequenz des Renin-Genes beim Menschen,
(Hobart et al., 1984).

Hogness-Box

CAAT-Box

X alternative Translation-Initiation-
Stelle

/// Transkription-Initiation-Stelle

-548 -500 -450
AGGTGTGALCCACCATGCTGGCCCTCTACTCTTAATAATTAAACCAAGCTGTTCCTTTCTGCCAAGAAACCACTCATGAAGATTCAACCATCTCTAGATGGGAAAC
-400 -350
TGGCTGTAGCTCGGAGAGGCCAGTCAGGCAAGAAAGCAAGTTAATATACAGATGGAGCTCCAGGATATAGGGCTGGGCTGGGCTAGGAGCTGGAACCTAAG
-300 -250
TATTACGGCTTCTCCAGCTTTGATGTTAGCTTCTGAGCAGCTCTGTTTCTCATCAGCCTCTGCTGCTCCAGGGGTCAGAGGCCAGCCAGATAGAGGCTGCTAGCGCT
-200 -150
ACTGGACACAAGATGCTTTCCACAGCTCTCTCTCTCCAGCCCTCTGCTGGGATCCGAAACCTGGTACCCCTACCCCACTAGCTCTGCTCCCGAGTGAATTT
-100 -50 -1+1
ATTGCTGACTGGCTTCCATCTACCCAGGTAATAATCAGGCGAGAGCAGAAATTCATCACCCTATGATGAGTCTATATAACGGGAAGGGCTAAGGAGCCAG
MetAspGly PheLysArg
AACCTCAGTGGATCTCAGAGAGACCCCACTCAGGGAAGCATGGATGGA-Exon 1(98 bp)-TTTAAACG GTAATTGGTAA-----CCTCCACCTGGGCG
gilePheLeu TyrMetAsp ThrG
AGCATCTTCTC-Exon 2(151 bp)-TACATGGAC GTGAGTGGTGGCTCAGCCCTGGTCTGCTCTG-----GCCCTCTCTTTTACCCCACTGAGT
InTyr TrnAlaCysV IleIleThr
AGTAC-Exon 3(124 bp)-ACTGCTGTG GTGAGACTA-----GTCCCTCTGCCAG TGTATCAC-Exon 4(119 bp)-ATCATCACC GTAAGTTGGGCG
ValGlyGly TyrAsnArg
G-----TCCTGTGCTCTCTCTCCACAG CTGCTGGA-Exon 5(197 bp)-TACAACAG GTGGGAGCTGGCACTCCAAAGGGCTAGGTGGGGGACAGGAG
Exon 6
GGACAAGAGATGGGAGTGAAGAGGAG-----CCTTCTGCTGTCTCTCTTCTCTGCAAGATTCCGA GTAAGAGACAAACCCCACTGGCTGTGACCTT
uAsnSerGln MetLysGln
CCAC-----CTTGTGGTCTCTGAGGTTTGGGTTTCCAAAGAGCTTCTGATCTTCTTTAG GAATCCCAA-Exon 7(120 bp)-ATGAAGGG GTCAAGAA
pValSerVal LeuPheAsp
TCCTCAACCTCTCCCGGCTG-----GCCCTCCCCAG GGTCTCTGTG-Exon 8(142 bp)-CTGTTTAT GTAAGAAGCCAAAGAGGC-----ACTCA
TyrValVal ValPheGln
AAGAAGGCTCTCTTTGCCCCCCACCCAG TATCTGCTG-Exon 9(99 bp)-GTATTTCAG GTGAGGTTGCA/TCGCCCCCTCTGGT-----CGGGTCAGGC
GluSerTyr LeuAlaArg
AAGCTGAAGAGGAATGCTCATGTGTGGTATGAGAAATCTCCCGCTCTCTGAGATGCCCTCTGCTGGGCTTATGCCCTCAGATGGAGAAITGGATGTGGAGTCTGCTG
CCCAGGAGGGCTGCTCTGAGCCTCTGGCCAGAGTGAACACTCTCTGAGATGCCCTCTGCTGGGCTTATGCCCTCAGATGGAGAAITGGATGTGGAGTCTGCTG
TGGATGGCTGGCTGACCCCTGCACAGCCCTCTCTGCTTTGAGGACAAGAGATAAAGACTTCATGTTAC AGCTGTGTGATCTGGGT

Abb. 12b: Nukleotidsequenz des Renin-Genes beim

Menschen (Miyazaki et al., 1984)

--- Hogness-Box

=== CAAT-Box

Bindungsstelle für die Glukokortikoide Hormone.

alternative Hogness-Box

alternative Translation-Initiation-Stelle.

die ihrerseits für die Induktion von Maus-Mammary-Tumor-Virus Genen bekannt sind (Scheidereit et al., 1973).

In dem ersten Intron befindet sich eine Sequenz, 110 bp stromaufwärts vom Ende des Introns, die mit der oben erwähnten Hogness-Box identisch ist (Abb.12a). Sollte diese Sequenz eine Promotor-Funktion ausüben, d.h. für die RNA-Polymerase ein zusätzliches Startsignal sein, so würde eine Population von kürzeren mRNA synthetisiert, bei der die Nukleotidsequenz, die für das Signalpeptid kodiert, verloren gegangen ist.

Das für die Initiation der Translation notwendige AUG-Kodon läßt sich ebenfalls 16 bp vom Anfang des zweiten Exons entfernt finden (Abb.12a). Sollte es tatsächlich als Translation-Initiation-Stelle benutzt werden, so würde ein Renin synthetisiert, das dem Signalpeptid des entledigt ist. Dieses Renin würde in der Zelle verbleiben und das Angiotensinogen intrazellulär im Cytosol spalten.

Eine andere Möglichkeit für eine zusätzliche mRNA-Population ergibt sich aus der Tatsache, daß die Nukleotidsequenz stromaufwärts, der durch Miyazaki bestimmten Transkription-Initiation-Stelle bereits einen geöffneten Leserahmen hat, d.h. für eine Aminosäuresequenz kodiert.

Miyazaki hat die Transkription-Initiation-Stelle aufgrund des Vergleiches der Nukleotidsequenz des Renin-Gens mit derjenigen der Renin-mRNA bestimmt und ihr die Position +1 zugeschrieben (Abb.12b). Die Möglichkeit, daß die stromaufwärts liegende, kodierende Region bei einer zusätzlichen mRNA-Population mittranskribiert wird, kann nicht ausgeschlossen werden. Obwohl eine Hogness-Box dieser theoretischen Transkription-Initiation-Stelle nicht eindeutig zugeschrieben werden kann, ist in der entsprechenden DNA-Region eine AT-reiche Sequenz zu finden, die eine starke Homologie zu der Hogness-Box aufweist (Abb.12b).

Translation dieser längeren mRNA könnte mit dem AUG-Kodon an der Position -41 beginnen, was zur Synthese von einem Renin führen würde, das an dem aminoterminalen Ende um 27 Aminosäuren länger wäre. Dieser zusätzliche aminoterminal Abschnitt der Reninkette hätte dann nicht die für ein Signalpeptid typischen, hydrophoben Eigenschaften und könnte demzufolge auch nicht den Transport des Renins durch die Membran bewirken.

Die Möglichkeiten, daß Renin zusätzlich zu seiner klassischen, sekretorischen Form als ein nicht sekretorisches Protein synthetisiert wird, wird durch die Ergebnisse der Untersuchung der Ren1- und Ren2-Genstruktur und Genexpression bei der Maus unterstützt.

1.2.2. Renin-Gen-Transkription bei der Maus

Trotz einer erheblichen Sequenzhomologie (96%) zeigen die Ren1 und Ren2 Gen-Produkte unterschiedliche biochemische Eigenschaften und eine unterschiedliche, gewebespezifische Expression.

Das Ren1-Gen ist sowohl in Ein- wie in Zweigenmausstämmen vorhanden und kodiert für ein thermostabiles, glykosyliertes Renin, das in relativ großen Mengen in der Niere und nur in kleinen Mengen in der submandibulären Drüse exprimiert wird .

Das Ren2-Gen dagegen ist nur in den Zweigenstämmen vorhanden und kodiert für ein thermolabiles, nicht glykosyliertes Renin, das nur in der submandibulären Drüse der Zweigenstämme exprimiert wird (Field et al, 1984a; Inagami et al., 1980; Panthier und Rouegon, 1983; Wilson und Taylor, 1982), (Abb.13).

Um die gewebespezifische Regulation der Renin-Gene kennenzulernen, wurden die für die Genexpression wichtigen 5'-Sequenzen des Renin-Gens analysiert (Field et al., 1984). Ein Nukleotidvergleich der 5'-Sequenzen des Ren1 und Ren2-Gens ergab, daß die 150 Nukleotide stromaufwärts vom Exon 1 bei beiden Genen

	Ein Renin-Gen Maus-Stamm	Zwei Renin-Gene Maus-Stamm	
	Ren1-Gen	Ren1-Gen	Ren2-Gen
Niere	+++	+++	-
Subman- dibuläre Drüse	+	+	+++++

Abb.13: Expression der Ren1 und Ren2-Gene in der submandibulären Drüse und der Niere bei der Maus (Field et al, 1984a; Inagami et al., 1980; Panthier et al., 1983; Wilson und Taylor, 1982).

fast identisch sind. Innerhalb dieser Sequenzen befinden sich identische Hogness-Boxen und 20 bp potentielle Z-DNA, der eine noch unbekannte regulatorische Funktion zugeschrieben wird (Nagata et al., 1980).

In der Niere der Maus mit einem Renin-Gen (Ren1) wurde eine Renin-mRNA identifiziert. Anhand der S1-Kartierung und der Primer Extension Analyse wurde die für diese mRNA verantwortliche Transkription-Initiation-Stelle dem Nukleotid +1 zugeschrieben. Relativ zu dieser Stelle befindet sich die Hogness-Box an der Position -25, (Abb.14a,b). Die Nukleotidsequenz der weiteren 5'-Regionen, die andere regulatorische Sequenzen beinhalten könnten, sind noch nicht identifiziert worden.

In der submandibulären Drüse derselben Maus, d.h. mit einem Renin-Gen (Ren1), wurden dagegen zwei verschieden lange Transkripte (mRNA) identifiziert. Die stärker vertretene, kürzere mRNA ist in der Länge und der Transkription-Initiation-Stelle der mRNA aus der Niere identisch, während die andere mRNA um 115 Nukleotide länger ist.

In der Niere einer Maus mit zwei Renin-Genen (Ren1 und Ren2) wird das Ren2-Gen nicht exprimiert. (Ergebnisse

PvuII

-475 -450 -425 -400

ACAGCAAGGGGAAGGCACTGGTGGTCTGGCAGCTGGAATGCTGGGAGGCCTTCTTGGGGGAGATTAGATTAAAGCTCTTCAGGGGAAGGCCTATTCCA

-375 XbaI -350 -325 -300

TGACTCCAGCATGGTGACTCTAGATGAAAGGAGGTAGTCTATGGTTTACAGCTTTATTGTAGACAGACAGAGAGAAGGTAGAAGCTAGAAGCCACTC

-275 -250 -225 -200

ATTGCCATGAAGAAGGAAGCGGGAGACAGCAGACGGAAACGTAAGAGTAAGAAAAACAAGACCTTTAGCAGACAGACAAGACAGAGGAGGAGGCAAGCAG

-175 HinfI -150 -125 -100

CCAAGTGGCTCTGGGGGTGGACTCTGGACAGCCTACATGACTGATGGCCACAGAATTATGGAGCTGGGTCTTGGCCAGAAAAACAGGCTGCCTTTCATGG

-75 -50 -25 -5 +1 DdeI +15

TCCCACAGGCCCTGGGGTAAATAATCAAAGCAGAGCCTGTGATACATGCTCTGTATAAAAAGAGGGCTCAGGGGTCTGGGCTACACAGCTCTTAGAAAGC

+25 +50 +75 HinfI

CTTGGCTGAACCAG ATG GAC AGA AGG AGG ATG CCT CTC TGG GCA CTC TTG TTG CTC TGG AGT GCT TGC ACC TTC AGT C

r>TrpLeuAsnGln MET ASP ARG ARG ARG MET PRO LEU TRP ALA LEU LEU LEU LEU TRP SER PRO CYS THR PHE SER L

+100 +125 +150 +175

TC CCA ACA CGC ACC GCT ACC TTT GAA CG GTAACCTGGGCAGACAAGGGGTGGCAGGTACAGGAACTGGCATCTTACTAACGCCCTC

EU PRO THR ARG THR ALA THR PHE GLU ARG

PvuII +200 +225

AGCTGTCTATACGTTGGATCATCCAGTCCTTTTGGCCAGCCAGTCAGGGATCTATG

Abb.14a: 5'-Region des Ren1-Gens bei der Maus (Field et al., 1984)



Hogness-Box

+1

Transkription-Initiation-Stelle

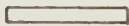
Kursivdruck: Alternative Aminosäuresequenz



Alternative Hogness-Box

-acI -700 -675 PvuII -650 -625
 1GCTCAGAGACTGGGCAGGCAGACAGCAGGAGAAGACACTGGGTGGTCTGGCAGCTGGAACGCTGGGAGGCCCTCTTGGGGAGATTAGATGAGGCTA
 -600 -575XbaI -550 -525
 .1CAGGGGAAGGCTATTCCATTCTCCAGCATGGTGAATCTAGATGAAAAGAGGTAGTGAATAGAGGCCAGCCATTGCCACAAAGAAGGTAAGAGTAA
 -500 -475 -450 -425
 GAGAACAGAGCTTAAGAAAGAGCCAAGATGGCTGGCAGATGGCTCAGTGGCTAAGAGCACCAGACTGCTCTTCCAAAGGTCGGAAGTCAAATCCCA
 -400 -375HinfI -350 -325
 CCAACCACATGGTGGCTCACAACCATCTCATAATGAGATCTGACTCCCTCTTCTTGGAGTGTCTGAAGACAGCTACAGTATATTTACATATAATAAAAAAT
 -300 -275 -250 -225
 AAATTTAAAAATAAAAAATAAAATTTAAGAGAGAGAGAGAGAGGAGGCCAAGCAGCCCATTTATAGTGGGCTGGGCTACCTTGTCTTTGTAG
 -200 -175 -150 -125 B
 GGTAACGTGGGAGGAGCAAACTGGCTATTGCCAGGTAACCTGGGGGGTGGAGTTACCTTGACTACTTGACTGATGGCCACAGAATGATGGAGGTGG
 amHI -100 -75 -50 -25
 ATCCITGGCCAGAAAACAGGCTGGCTTTTCATGGTCCACAGGCCCTGGGGTAATAAATCAGAGCAGAGCCCTGTGATACATCGTCTGTATAAAAGAGGCT
 MetValCysIleLysGluGlyS
 -5 +1 DdeI +25 +50
 CAGGGGGTCTGGGCTACACAGCTCTTAGAAAGCCTTGGCTGAACAG ATG GAC AGG AGG AGG ATG CCT CTC TGG GCA CTC TTG TGG
 erGlyGlyLeuGlyTyrThrAlaLeuArgLysProTrpLeuAsnGln MET ASP ARG ARG ARG MET PRO LEU TRP ALA LEU LEU LEU
 +75 HinfI +100 +125
 CTC TGG AGT CCT TGC ACC TTC AGT CTC CCA ACG GGC ACC ACC TTT GAA CG GTAACCTGGGCAGAGAAGGGTGGCAGG
 LEU TRP SER PRO CYS THR PHE SER LEU PRO THR GLY THR THR PHE GLU ARG
 150 +175 PvuII +200
 TACAGGAACCTGGCATCTTACTAAGGCCCTCAGCTGTCTATGGCTTGGGTATCATCAGTCC

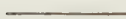
Abb.14b: 5'-Region des Ren2-Gens bei der Maus (Field et al., 1984).



Hogness-Box

+1

Transkription-Initiation-Stelle



Alternative Hogness-Box

Kursivdruck: Alternative Aminosäuresequenz

biochemischer Untersuchungen, die in dem Fall nur thermostabiles, glykosyliertes Renin, also Ren1-Gen Produkt, identifiziert haben (Bing et al., 1980; Panthier et al., 1982)).

Das Ren1-Gen wird normal, ähnlich wie bei der Maus mit einem Renin-Gen, exprimiert.

In der submandibulären Drüse der Maus mit zwei Renin-Genen wurden, ähnlich wie bei der Maus mit einem Renin-Gen, zwei verschieden lange mRNA identifiziert. Die Möglichkeit, daß die längeren Transkripte durch verschiedene Transkription-Termination-Stellen zustandekommen, wurde anhand der S1-Nuklease-Kartierung der 3'-Enden dieser Transkripte ausgeschlossen. Alle untersuchten mRNA terminieren 12 Nukleotide stromabwärts der Polyadenylierungs-sequenz AATAAA (Field et al., 1984). Die Möglichkeit einer alternativen Transkription-Initiation-Stelle oder eines alternativen Spleißprozesses als eine Erklärung für diese Längenvariabilität wurde nicht untersucht.

1.3. Spleißprozeß

Obwohl die Syntheserate von gewebespezifischen Proteinen meist auf der Ebene der Transkription entschieden wird, kann auch die Bearbeitung des primären DNA-Transkriptes eine zentrale Rolle bei der Regulation der Gen-Expression spielen.

Bei der Bearbeitung des primären Transkripts müssen Teile aus der Mitte des Moleküls herausgeschnitten werden und die verbliebenen Stücke dann wieder richtig zusammengesetzt werden. Die Stellen, an denen die Exons herausgeschnitten werden, lassen sich durch einen Vergleich der unreifen mRNA mit der gespleißten (Reifen) mRNA identifizieren. Die Untersuchung der Nukleotidsequenz von vielen solchen Stellen hat ergeben, daß die Nukleotidsequenz in dem Bereich der Intron-Exon-Grenzen in allen Genen übereinstimmend ist. Es wurde daher angenommen, daß diese konservierte Sequenz eine Erkennungssequenz für das Spleißen ist (Breatnach et al., 1978).

Es muß aber dabei berücksichtigt werden, daß bei einer Sequenzanalyse diejenigen mRNA's untersucht werden, die in der Überzahl vertreten sind. Eine alternativ gespleißte mRNA kann deshalb verdeckt bleiben, und folglich nicht identifizierbar sein.

1.3.1. Spleißen der Renin-mRNA bei Mensch und Maus.

Die Positionen der Spleißstellen im Renin-Gen wurden durch einen Vergleich zwischen der Renin-mRNA Sequenz (Imai et al., 1983; Soubrier et al., 1983) und der Sequenz des Renin-Gens (Hobart et al., 1984; Miyazaki et al., 1984) identifiziert.

Im Einklang mit dem allgemeinen AG/GT Spleiß-Modell (Breatchnach et al., 1978) beginnen alle auf diese Art und Weise identifizierten Introns mit dem Nukleotid GT und enden mit AG. Diese Intron-Exon-Grenzen stimmen auch mit der allgemeineren Spleiß-Standard-Sequenz (Breathnach und Chambon, 1981) überein.

Durch eine unvoreingenommene Betrachtung des Gens lassen sich alternative Spleißstellen in den Introns A, B, C, G und H finden (Hobart et al., 1984), (Abb.15).

Das Spleißen an diesen alternativen Stellen eliminiert unter anderem basische Aminosäuren in Exon 2 und ein Cystein im Exon 3. Dies könnte sowohl eine wesentliche Änderung im Processing als auch in der Tertiärstruktur des Renins bewirken.

Zusätzlich zu der durch das AG/GT Spleiß-Modell bedingten alternativen Spleiß-Möglichkeit wurde bei den

Exon 1	Exon 2
↓ ACCACCTTTAAACG GTAATT..Intron A..GGCCAG	↓ GATCTTCCTCAAGAGA
ThrThrPheLyaAr	gIlePheLeuLysArg
Exon 2	Exon 3
AACTACATGGAC GTGAGT..Intron B..CCACAG	↓ ACCCAGTACTATGGCGAG
AsnTyrMetAsp	ThrGlnTyrTyrGlyGlu
Exon 3	Exon 4
↓ TACACTGCCCTGTG GTGAGA..Intron C..TGCCAG	TGTATCACAAAGCTC
TyrThrAlaCysV	alTyrHisLysLeu
Exon 7	Exon 8
AAGGTGTTTGAT GTAAGA..Intron G..CCCCAG	↓ TATGTCGTGAAG
ArgLueHisGlu	TyrValValLys
Exon 8	Exon 9
↓ TATGTATTTTCAG GTGGAG..Intron H..TGCCAG	GAATCCTACAGTAGT
TyrValLeuGln	GluSerTyrSerSer

Abb.15: Alternative Spleißstellen bei dem Renin-Gen.
(Hobart et al., 1984).

tierischen Zellen ein alternativer Spleiß-Prozeß beobachtet, bei dem je nach gegebenen Bedingungen, ganze Exons eliminiert werden können. Primäre Gentranskripte, bei denen verschiedene reife mRNA's entstehen und die dementsprechend verschiedene Proteine liefern, sind inzwischen bekannt (Amara et al., 1982; Edwards et al., 1983; Falkenthal et al., 1985; Medford et al., 1984; Rosenfeld et al., 1985).

Zur Zeit ist für Renin noch nicht untersucht worden, ob die Entstehung der längeren Transkripte auf die Benutzung einer alternativen Transkription-Initiation-Stelle (siehe oben), oder auf einen alternativen Spleiß-Prozeß zurückzuführen ist. Die Tatsache, daß in der submandibulären Drüse zwei verschieden lange Renin-mRNA identifiziert wurden, unterstützt die Hypothese, daß Renin in zwei Isoformen mit verschiedener zellulärer Lokalisation, jedoch identischer enzymatischer Aktivität, in den juxtaglomerulären Zellen synthetisiert werden könnte.

1.4. Renin-Aminosäuresequenz beim Mensch und bei der Maus

1982 wurde die vollständige Aminosäuresequenz für das reife Renin aus der submandibulären Drüse der Maus mit konventionellen Aminosäuresequenzierungs-Methoden bestimmt (Misomo et al., 1982). Das menschliche renale Renin, das sich von dem Renin aus der submandibulären Drüse der Maus in biochemischen Eigenschaften unterscheidet (Bing et al., 1980; Inagami, 1981), konnte wegen seiner niedrigen Konzentration in der Niere nicht in genügenden Mengen gereinigt werden, um eine konventionelle Sequenzierung vornehmen zu können. Die vollständige Aminosäuresequenz für das menschliche renale Renin wurde daher aus der Nukleotidsequenz der Renin-mRNA abgeleitet (Imai et al., 1983; Soubrier et al., 1983), (Abb.16).

Obwohl eine eukaryontische Translation normalerweise mit dem ersten für Methionin kodierenden AUG-Kodon anfängt, gibt es bei den eukaryontischen mRNAs Beispiele, wo ein internes AUG Kodon als eine Translation-Initiation-Stelle benutzt wird (Kozak, 1981). In der menschlichen, für Preprorenin kodierenden mRNA wird das

Human	Met	Asp	Gly	Trp	Arg	Arg	Met	Pro	Arg	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Ser	Pro	Cys	20	
Mouse	Met	Asp	Arg	Arg	Arg	Met	Pro	Leu	Trp	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Ser	Pro	Cys	20		
Human	Thr	Phe	Gly	Leu	Pro	Thr	Asp	Thr	Thr	Thr	Phe	Lys	Arg	Ile	Phe	Leu	Lys	Arg	Met	Pro	40	
Mouse	Thr	Phe	Ser	Leu	Pro	Thr	Gly	Thr	Thr	Thr	Phe	Gly	Arg	Ile	Pro	Leu	Lys	Arg	Met	Pro	40	
Human	Ser	Ile	Arg	Glu	Ser	Leu	Lys	Glu	Arg	Gly	Val	Asp	Met	Ala	Arg	Leu	Gly	Pro	Glu	Trp	60	
Mouse	Ser	Val	Arg	Glu	Ile	Leu	Glu	Glu	Arg	Gly	Val	Asp	Met	Thr	Arg	Leu	Ser	Ala	Glu	Trp	60	
Human	Ser	Gln	Pro	Met	Lys	Arg	Leu	Thr	Leu	Gly	Asn	Thr	Thr	Ser	Ser	Val	Ile	Leu	Thr	Asn	80	
Mouse	Asp	Val	Phe	Thr	Lys	Arg	Ser	Ser	Leu	Thr	Asp	Leu	Ile	Ser	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asn	80	
Human	Tyr	Met	Asn	Thr	Gln	Tyr	Tyr	Gly	Glu	Ile	Gly	Ile	Gly	Thr	Pro	Pro	Gln	Thr	Phe	Lys	100	
Mouse	Tyr	Leu	Asn	Ser	Gln	Tyr	Tyr	Gly	Glu	Ile	Gly	Ile	Gly	Thr	Pro	Pro	Gln	Thr	Phe	Lys	100	
Human	Val	Val	Phe	Asp	Thr	Gly	Ser	Ser	Asn	Val	Trp	Val	Pro	Ser	Ser	Lys	Cys	Ser	Arg	Lys	120	
Mouse	Val	Ile	Phe	Asp	Thr	Gly	Ser	Ala	Asn	Leu	Trp	Val	Pro	Ser	Thr	Lys	Cys	Ser	Arg	Lys	120	
Human	Tyr	Thr	Ala	Cys	Val	Tyr	His	Lys	Leu	Phe	Asp	Ala	Ser	Asp	Ser	Ser	Ser	Tyr	Lys	His	140	
Mouse	Tyr	Leu	Ala	Cys	Gly	Ile	His	Ser	Leu	Tyr	Gly	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Ser	Tyr	Lys	His	140	
Human	X	X	X	Thr	Glu	Leu	Thr	Leu	Arg	Tyr	Ser	Thr	Gly	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Leu	Ser	Gln	160
Mouse	Asn	Gly	Asp	Asp	Phe	Thr	Ile	His	Tyr	Gly	Ser	Gly	Ser	Arg	Val	Lys	Gly	Phe	Leu	Ser	Gln	160
Human	Asp	Ile	Ile	Thr	Val	Gly	Gly	Ile	Thr	Val	Thr	Gln	Met	Phe	Gly	Glu	Val	Thr	Glu	Met	180	
Mouse	Asp	Ser	Val	Thr	Val	Gly	Gly	Ile	Thr	Val	Thr	Gln	Met	Phe	Gly	Glu	Val	Thr	Glu	Met	180	
Human	Pro	Ala	Leu	Pro	Phe	Met	Leu	Ala	Glu	Phe	Asp	Gly	Val	Val	Gly	Met	Gly	Phe	Ile	Glu	200	
Mouse	Pro	Leu	Ile	Pro	Phe	Met	Leu	Ala	Gln	Phe	Asp	Gly	Val	Leu	Gly	Met	Gly	Phe	Pro	Ala	200	
Human	Gln	Ala	Ile	Gly	Arg	Val	Thr	Pro	Ile	Phe	Asp	Asn	Ile	Ile	Ser	Gln	Gly	Val	Leu	Lys	220	
Mouse	Gln	Ala	Val	Gly	Gly	Val	Thr	Pro	Val	Phe	Asp	His	Ile	Leu	Ser	Gln	Gly	Val	Leu	Lys	220	
Human	Glu	Asp	Val	Phe	Ser	Phe	Tyr	Tyr	Asn	Arg	Asp	Ser	Glu	Asn	Ser	Gln	Ser	Leu	Gly	Gly	240	
Mouse	Glu	Lys	Val	Phe	Ser	Val	Tyr	Tyr	Asn	Arg	Gly	Pro	His	Leu	Gly	Val	Leu	Lys	Gly	Gly	240	
Human	Gln	Ile	Val	Leu	Gly	Gly	Ser	Asp	Pro	Gln	His	Tyr	Gln	Gly	Asn	Phe	His	Tyr	Ile	Asn	260	
Mouse	Glu	Val	Val	Leu	Gly	Gly	Ser	Asp	Pro	Gln	His	Tyr	Gln	Gly	Asp	Phe	His	Tyr	Val	Ser	260	
Human	Leu	Ile	Lys	Thr	Gly	Val	Trp	Gln	Ile	Gln	Met	Lys	Gly	Val	Ser	Val	Gly	Ser	Ser	Thr	280	
Mouse	Leu	Ser	Lys	Thr	Asp	Ser	Trp	Gln	Ile	Thr	Met	Lys	Gly	Val	Ser	Val	Gly	Ser	Ser	Thr	280	
Human	Leu	Leu	Cys	Glu	Asp	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Val	Asp	Thr	Gly	Ala	Ser	Tyr	Ile	Ser	Gly	300	
Mouse	Leu	Leu	Cys	Glu	Glu	Gly	Cys	Glu	Val	Val	Val	Asp	Thr	Gly	Ser	Ser	Phe	Ile	Ser	Ala	300	
Human	Ser	Thr	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Leu	Met	Glu	Ala	Leu	Gly	Ala	Lys	Glu	Lys	Arg	Leu	Phe	319	
Mouse	Pro	Thr	Ser	Ser	Leu	Lys	Leu	Ile	Met	Gln	Ala	Leu	Gly	Ala	Lys	Glu	Lys	Arg	Leu	His	319	
Human	Asp	Tyr	Val	Val	Lys	Cys	Asn	Glu	Gly	Pro	Thr	Leu	Pro	Asp	Ile	Ser	Phe	His	Leu	Gly	329	
Mouse	Tyr	Val	Val	Ser	Cys	Ser	Gln	Val	Pro	Thr	Leu	Pro	Asp	Ile	Ser	Phe	His	Leu	Gly	329		
Human	Gly	Lys	Glu	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ser	Ala	Asp	Tyr	Val	Phe	Gln	Glu	Ser	Tyr	Ser	Ser	Lys	359	
Mouse	Gly	Arg	Ala	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Thr	Asp	Tyr	Val	Phe	Gln	Tyr	Pro	Asn	Arg	Arg	Asp	359	
Human	Lys	Leu	Cys	Thr	Leu	Ala	Ile	His	Ala	Met	Asp	Ile	Pro	Pro	Pro	Thr	Gly	Pro	Thr	Trp	379	
Mouse	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Leu	His	Ala	Met	Asp	Ile	Pro	Pro	Pro	Thr	Gly	Pro	Val	Trp	379	
Human	Ala	Leu	Gly	Ala	Thr	Phe	Ile	Arg	Lys	Phe	Tyr	Thr	Glu	Phe	Asp	Arg	Arg	Asn	Asn	Arg	399	
Mouse	Val	Leu	Gly	Ala	Thr	Phe	Ile	Arg	Lys	Phe	Tyr	Thr	Glu	Phe	Asp	Arg	His	Asn	Asn	Arg	399	
Human	Ile	Gly	Phe	Ala	Leu	Ala	Arg	406														
Mouse	Ile	Gly	Phe	Ala	Leu	Ala	Arg															

Abb. 16: Aminosäuresequenz des Renins beim Menschen und bei der Maus (Murakami et al., 1984).

▼ proteolytische Spaltstellen
XXX Glykosylierungsstellen

das erste AUG Kodon als Translation-Initiation-Stelle angenommen, obwohl zwei zusätzliche AUG Kodons (Aminosäure Position 7 und 39, Abb.16) in dem N-terminalen Teil vorhanden sind. Sollte das dritte AUG Kodon alternativ zu dem ersten Kodon als Translation-Initiation-Stelle benutzt werden, so würde ein verkürztes, nicht-sekretorisches Renin synthetisiert.

Obwohl die Länge des Signalpeptides experimentell noch nicht bestimmt wurde, deutet eine Sequenzhomologie mit anderen sekretorischen Proteinen auf eine Spaltung hinter dem Glycin -18, dem Cystein -20, oder dem Glycin -23 (Abb.16).

Die Tatsache, daß in der menschlichen Niere ein Renin gefunden wurde, das durch Trypsin aktiviert wird (Inagami et al., 1983), führte zu der Annahme, daß Renin zuerst in einer inaktiven Proform vorliegt, welche durch eine proteolytische Spaltung in ein aktives Renin überführt wird. Aufgrund des Vergleiches mit dem reifen Renin aus der submandibulären Drüse, für welches der Aminotermminus experimentell bestimmt wurde, (Misomo et al., 1982; Panthier et al., 1982) nimmt man an, daß diese Spaltung hinter den Aminosäuren Lysin, Position 65; Arginin, Position 66, stattfindet. Da eine Spaltung hinter zwei basischen Aminosäuren häufig beim Pro-

cessing von Peptidhormonen vorkommt, kommen zwei andere basische Aminosäuren-Paare an der Position 31, 32 und 37, 38 als alternative Spaltungsstellen in Frage (Murakami et al., 1984).

Das reife menschliche Renin besteht aus 337 bzw. 340 Aminosäuren und weist 68% Homologie mit dem Renin aus der submandibulären Drüse und der Niere der Maus auf. Eine Deletion von drei Aminosäuren kommt in dem SMG-Renin an der Stelle 232-234 vor, während dem Renin beim Menschen im Vergleich zur SMG-Renin der Maus eine Aminosäure an der Position 316 fehlt (Abb. 16).

Das Maus-Renin kann zusätzlich in ein 288 Aminosäuren langes Peptid-A und ein 48 Aminosäure langes Peptid-B gespalten werden (Misomo et al., 1982), (Abb.17).

Es ist vorläufig noch nicht bekannt, ob diese Spaltung auch am menschlichen Renin vorgenommen wird. Im Gegenteil, neueste biochemische Untersuchungen zeigen, daß dieser Schritt nicht notwendig für die Aktivierung des Renin beim Menschen ist (Cantazaro et al., 1983).

Das menschliche Renin weist zwei Glykosylierungsstellen auf: Asn-Thr-Thr an der Position 71-73 und Asn-Gly-Thr an der Position 141-143 (Abb.16). Diese Glykosylierungsstellen werden durch die Exons 2 und 4 kodiert und befinden sich somit beide im Aminoterminalen Teil des reifen Renins.

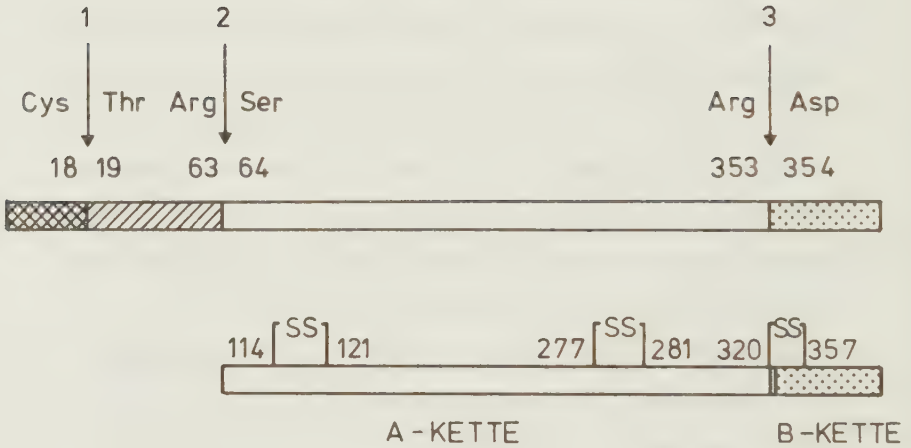


Abb.17: Das Prozessing von Preprorenin zur Prorenin und reifen Renin in der Niere und in der submandibulären Drüse der Maus.

- 1 - Spaltstelle bei der Reifung von Preprorenin zu Renin.
 - 2 - Spaltstelle bei der Reifung von Prorenin zu Renin.
 - 3 - Spaltstelle des Renins in Peptid A und Peptid B
- (Panthier et al., 1982)

Das renale Renin der Maus hat nur eine Glykosylierungsstelle. Sie stimmt mit der Glykosylierungsstelle des menschlichen Renins an der Position 71-73, überein (Abb.16). Das SMG Renin der Maus hat keine Glykosylierungsstellen.

Der hohe Konservierungsgrad der Aspartate (Position 104, resp. 292) als auch deren flankierenden Sequenzen in allen untersuchten Reninen deutet darauf hin, daß diese zwei sauren Aminosäuren eine katalytische Funktion ausüben. Die Sequenzen Phe-Asp-Thr-Gly-Ser, Position 103-107 resp. Asp-Thr-Gly, Position 292-294 finden sich nicht nur bei Renin, sondern auch bei anderen Aspartyl-Proteasen, solchen wie Pepsin, Chymosin, Penicillopepsin (Abb.18).

Zusätzlich zu den zwei konservierten Aspartaten scheinen auch andere Aminosäuren eine katalytische Funktion auszuüben. Das Serin, Position 107, im menschlichen Renin könnte eine Wasserstoffbrücke mit dem Carboxyl-Sauerstoff des Asp 104 eingehen, wie es für das Renin der Maus bereits vorgeschlagen wurde (Inagami et al., 1983), (Abb. 18). Die Aminosäuren Thr, Position 293, und Gly, Position 294, denen bei Penicillopepsin eine katalytische Aktivität zugeschrieben wurde, sind beim menschlichen Renin an derselben Aminosäureposition

Protease	Aminosäuresequenz									
Renin, Mensch	-Val-Phe-Asp-Thr-Gly-Ser-Ser-Asn-	Trp	Tyr							
Renin, Maus	-Ile-Phe-Asp-Thr-Gly-Ser-Ala-Asn-	Trp	Tyr							
Pepsin, Mensch	-Val-Phe-Asp-Thr-Gly-Ser-Ser-Asn-	Trp	Tyr							
Pepsin, Schwein	-Ile-Phe-Asp-Thr-Gly-Ser-Ser-Asp-	Trp	Tyr							
Chymosin, Rinde	-Leu-Phe-Asp-Thr-Gly-Ser-Ser-Asp-	Trp	Tyr							
Penicillopepsin	-Asn-Phe-Asp-Thr-Gly-Ser-Ala-Asp-	Trp	Tyr							
AMCS-Position	102 103 104 105 106 107 108 109	111	149							

Protease	Aminosäuresequenz									
Renin, Mensch	-Leu-Val-Asp-Thr-Gly-Gly-Ser-Tyr-	Ser	Arg							
Renin, Maus	-Val-Val-Asp-Thr-Gly-Ser-Ser-Phe-	Ser	Arg							
Pepsin, Mensch	-Ile-Val-Asp-Thr-Gly-Thr-Ser-Leu-	Thr	Arg							
Pepsin, Schwein	-Ile-Val-Asp-Thr-Gly-Thr-Ser-Leu-	Thr	Arg							
Chymosin, Rinde	-Ile-Leu-Asp-Thr-Gly-Thr-Ser-Lys-	Val	Arg							
Penicillopepsin	-Ile-Ala-Asp-Thr-Gly-Thr-Thr-Leu-	Leu	Lys							
AMCS-Position	290 291 292 293 294 295 296 297	299	321							

Abb.18: Aktive Stellen der Aspartyl-Proteasen.

(Murakami et al., 1981)

vorhanden Murakami et al., 1984). Die Homologie zwischen Renin und anderen Aspartyl-Proteasen sowohl in der Genstruktur wie auch in der Aminosäuresequenz deutet darauf hin, daß trotz des unterschiedlichen pH-Optimums der katalytische Mechanismus des Renins dem Mechanismus der anderen Aspartyl-Proteasen ähnlich ist. Die Verteilung der homologen Aminosäuren in den Aspartyl Proteinasen durch das ganze Molekül hindurch legt die Annahme nahe, daß die tertiäre Struktur des Renins ähnlich der Struktur von Pepsin und Penicillopepsin ist.

2. Angiotensin

2.1. Angiotensinogen-Gen Struktur bei der Ratte

Das für das Ratten-Preangiotensinogen kodierende Gen besteht aus fünf Exons, die durch vier Introns unterbrochen werden. Exon 1 wird nicht translatiert, was bedeutet, daß es sich innerhalb der nicht translatierten 5'-Region der mRNA befindet. Das zweite Exon wird ab dem Nukleotid 30 translatiert. Die ersten 72 translatierten Nukleotide kodieren für das Signalpeptid. Es folgen 30 für das Angiotensin I kodierende Nukleotide.

Die restlichen 657 Nukleotide des zweiten Exons kodieren für ein Peptid, dessen Bedeutung später erläutert wird. Die darauf folgenden drei Exons sind 267, 144, und 458 bp lang. Die Introns sind ungefähr 5500, 2500, 1400, und 600 bp lang (Tanaka et al., 1984), (Abb.19).

Die angegebenen Intron-Exon-Grenzen wurden durch den Vergleich der Nukleotidsequenz der Angiotensinogen-mRNA (Ohkubo et al., 1983) mit der Nukleotidsequenz des Angiotensinogen-Gens bestimmt.

Wie bei Renin weist jedoch eine unvoreingenommene Betrachtung des Angiotensinogen-Gens auf alternative Spleißstellen hin. Spleißen an diesen Stellen eliminiert in Exon 2 die Aminosäuren Val, His, Phe, Gln, Gly und im Exon 3 Lys, oder nur im Exon 3 die Aminosäuren Lys, Meth, Arg oder nur im Exon 4 die Aminosäuren Val, Gly, Glu (Abb.20).

Obwohl die Struktur des Angiotensinogen-Gens beim Menschen noch nicht bekannt ist, kann man aufgrund der Nukleotidsequenzhomologie mit der Angiotensinogen-mRNA bei der Ratte (Ohkubo et al., 1983; Kageyama et al., 1984) annehmen, daß seine Exon-Intron-Organisation dem Angiotensinogen-Gen bei der Ratte ähnlich ist.

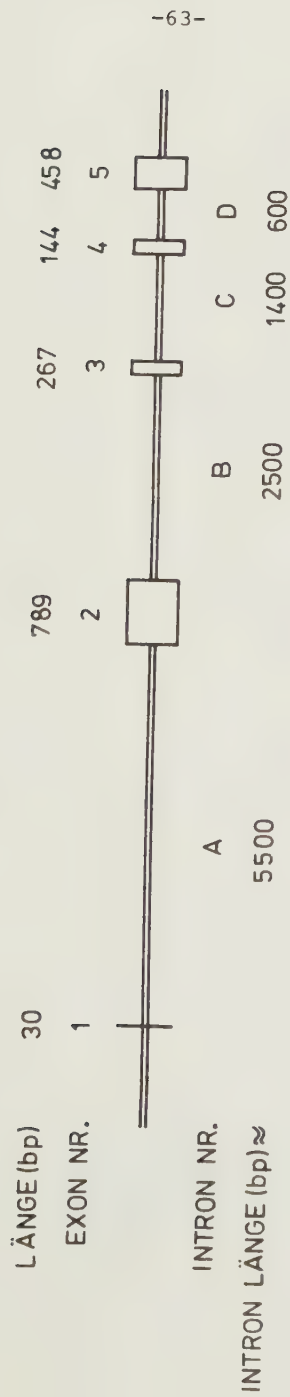


Abb. 19: Organisation des Angiotensinogen - Genes
(Tanaka et al., 1984).

Exon 1

Exon 2

GGCTGGAGCTAAAG GTAAGC..Intron A..TTCCAG GACACACAGAAGCA

Exon 2

Exon 3

↓ CGTTCACTTCCAAG GTGAGG..Intron B..TTTCAG GGAAGATGAGAGGC
↑

ValHisPheGlnG

lyLysMetArgThr

Exon 3

Exon 4

AACCCGCCTCCTCG GTAGGA..Intron C..CCACAG GGCCATCCGTCTG

AsnProProProAr

gAlaIleArgThr

Exon 4

Exon 5

↓ CCCGAGTGGGAGAG GTGAGT..Intron D..TTGCAG CTTCTCAACACCAT

ArgValGlyGlu

ValLeuAsnSer

Abb.20: Nukleotid und Aminosäuresequenz der Intron-
Exon-Grenzen beim Angiotensinogen-Gen.
Pfeile zeigen alternative Spleißstellen an.

Die Struktur des Angiotensinogen-Gens bei der Ratte zeigt eine auffallende Ähnlichkeit mit der Struktur des α_1 -Antitrypsin Gens (Kidd et al, 1983; Leicht et al, 1982). Die kodierenden Sequenzen der beiden Gene sind durch vier Introns unterbrochen (Abb.21) und die Intron-Exon-Grenzen befinden sich an homologen Stellen (Abb.22). Es ist daher vorgeschlagen worden, (Tanaka et al., 1984), daß Angiotensinogen und α_1 -Antitrypsin Gene durch Duplikation eines gemeinsamen, ancestralen Gens entstanden sind und daß ihre Gen-Produkte eine ähnliche physiologische Funktion haben könnten.

2.2. Angiotensinogen-Gen Transkription.

Die Kontrolle der Transkription des Angiotensinogen-Gens bei der Ratte wurde der Hogness-Box zugeschrieben, die sich 25 Nukleotide stromaufwärts der Transkription-Initiation-Stelle befindet (Tanaka et al., 1984), (Abb.23). Die Nukleotidsequenz der weiteren 5'-Regionen, die andere regulatorische Elemente beinhalten könnte, ist noch nicht identifiziert worden.

Eine Nukleotidsequenzanalyse wie auch eine RNA-Hybridisierung haben gezeigt, daß die Angiotensinogen-mRNA aus der Leber in zwei verschiedenen Längen vorkommt (Kageyama et al., 1984).

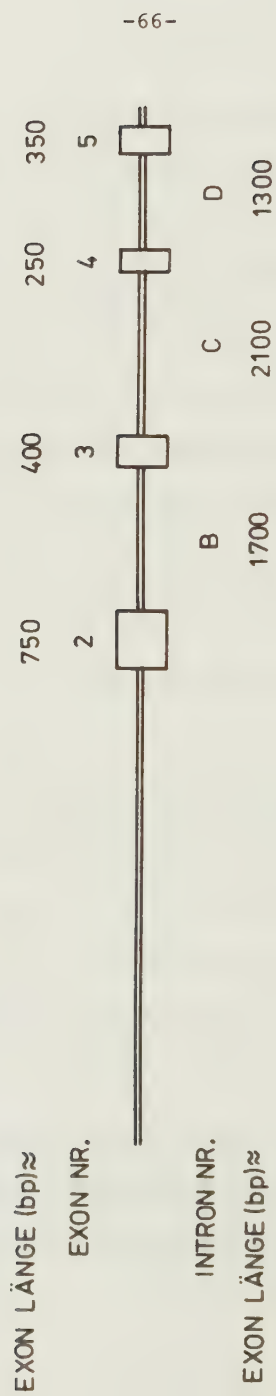


Abb. 21: Organisation des α_1 -Antitrypsin Genes
(Leicht et al., 1982).

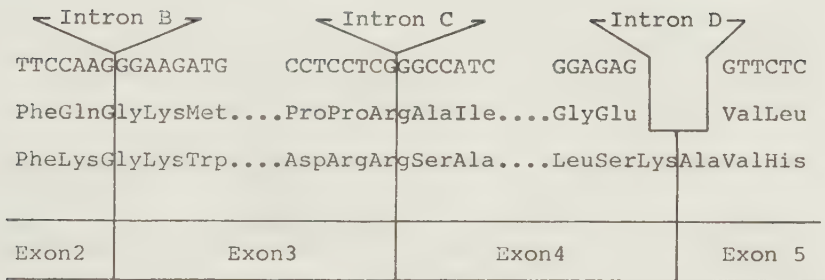


Abb.22: Nukleotide und Aminosäuresequenzen der
Exon-Intron Grenzen des Angiotensinogens (obere
Zeile) und des α_1 - Antitrypsin.
(Tanaka et al., 1984)

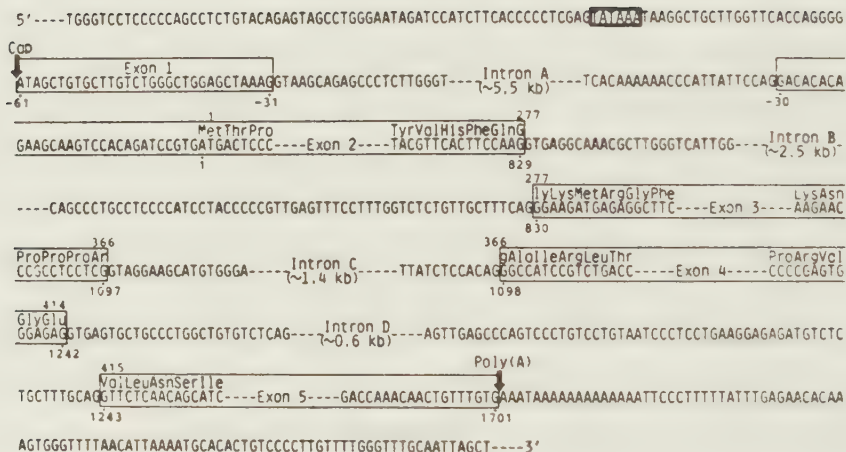
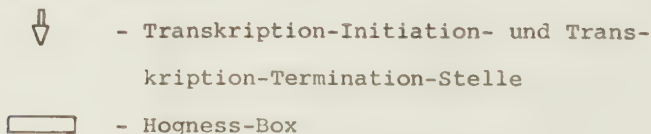


Abb.23: Primäre Struktur des Preangiotensinogen-mRNA
beim Mensch.



Eine S1-Nuklease Kartierung der 5'-Enden der mRNA hat die Möglichkeit ausgeschlossen, daß die unterschiedliche Länge der Angiotensinogen-mRNA durch alternative Transkription-Initiation-Stellen zustandekommt, während die S1-Nuklease Kartierung der 3'-Enden gezeigt hat, daß die Längenvariabilität der mRNA auf verschiedene Transkription-Termination-Stellen zurückzuführen ist. Die Sequenz AAUAAA, die als Signal für die Polyadenylierung dient, wurde in der längeren mRNA 12 Nukleotide stromaufwärts der Polyadenylierungs-Stelle gefunden, während in der kürzeren mRNA die Sequenz AUUAAA 20 bp von der Polyadenylierungs-Stelle entfernt ist (Kageyama et al., 1984).

Zwei verschieden lange Angiotensinogen-mRNA wurden auch im Gehirn der Ratte identifiziert (Kunapuli und Kumar, 1986). Die Autoren vermuten, daß diese Längenvariabilität auf einen alternativen Spleißprozess und nicht wie bei der Angiotensinogen-mRNA aus der Leber auf alternative Transkription-Termination-Stelle zurückzuführen ist.

2.3. Angiotensinogen-Aminosäuresequenz.

Eine vollständige, für das menschliche Preangiotensinogen kodierende Sequenz besteht aus 1458 Nukleotiden, die für 486 (477 bei der Ratte) Aminosäuren kodieren

(Kageyama et al., 1984).

Zwei mögliche Translation-Initiation-Stellen können anhand der Nukleotidsequenz bestimmt werden. Das Methionin an der Aminosäureposition -24, das genau der Translation-Initiation-Stelle bei der Ratte entspricht (Ohkubo et al., 1983), und das Methionin an der Position -33, das dem 5'-Ende der mRNA am nächsten liegt (Abb.24). Die Translation einer eukaryontischen mRNA beginnt normalerweise mit dem ersten AUG-Kodon. Bei manchen eukaryontischen mRNA's jedoch scheint die Translation mit einem internen AUG-Kodon anzufangen. In noch anderen Fällen werden wechselweise das erste und das zweite interne AUG-Kodon als Translation-Initiation-Stelle benutzt (Hendy und Kronenberg, 1981; Jay et al., 1981). Es ist gezeigt worden, daß die das AUG-Kodon umgebende Sequenz und nicht die dem 5'-Ende relativ am nächsten liegende Position des Kodons entscheidend für die Effizienz der Translation ist. Ein AUG-Kodon, das sich in der AGXXAUGG Sequenz befindet, wird am häufigsten als Translation-Initiation-Stelle benutzt (Kozak, 1981).

In der menschlichen Angiotensinogen-mRNA ist es das zweite AUG-Kodon, das von dieser Sequenz umgeben ist. Die Benutzung des zweiten AUG-Kodons bei der Translation der Angiotensinogen-mRNA kann daher nicht ausgeschlossen werden.

5'-AGGAAGCGCCGUGUUGUGGUACACGACGAAGGUGG-3'																												Arg Lys CGG AAG	-31		
Arg	Ala	Pro	Gln	Ser	Glu	Ala	Pro	Ala	Gly	Val	Ser	Leu	Arg	Gly	Thr	Ile	Leu	Cys	Leu	Leu	Ala	Trp	Ala	Gly	Leu	Ala	Ala	Gly	-1		
CGA	GCA	CCC	GAC	CEU	GUG	GGU	CEU	GCC	GGU	GUG	AGC	CEU	Arg	GCC	ACC	AUC	CUC	UGC	CUC	CUG	GCC	UGG	GCG	GCG	CEU	GCU	GCA	GGU	-1		
Asp	GAA	Val	Tyr	Ile	His	Pro	His	Leu	Cys	Val	Ile	His	Asn	Glu	Gly	Thr	Cys	Glu	Gln	Ala	Ala	Asn	Ala	Gly	Lys	Pro	Glu	Glu	10		
CGC	GGG	GUG	UAC	AUA	CAC	CCC	UUC	CA	CUG	Ile	GUC	AAC	AAU	GAC	AGU	ACC	UGU	GAC	CAG	CAG	GCA	AAG	GCC	AAU	GCC	AAU	CCC	AAA	10		
Asp	Pro	Gln	Phe	Ile	His	Pro	Gln	Cys	Ala	Gln	Ala	Thr	Ser	Val	Asp	Glu	Cys	Leu	Ala	Gln	Ala	Gln	Ala	Gly	Lys	Pro	Val	Ala	40		
GAC	CCC	ACC	AUC	UUA	AUA	CCU	CEU	CCA	AUU	CAG	GCC	AAG	ACA	UCC	CEU	GUG	GAU	GAA	AAG	GCC	CUA	CAG	CAG	CAG	CUG	GUG	CUA	GUC	CEU	140	
Lys	Asp	Asp	Thr	Glu	Asp	Lys	Leu	Arg	Ala	Met	Val	Gly	Met	Leu	Asn	Phe	Leu	Gly	Phe	Arg	Ile	Tyr	Gly	Met	His	Ser	Glu	90			
AAU	CUU	GAC	ACC	GAA	GAC	AUG	UAG	AGG	GCC	GCA	AGC	AUG	GUC	GGG	AAG	GUC	CCC	AAC	UUG	GGC	UUC	CEU	AUA	UAU	GCG	AAC	CAG	AGU	GAG	270	
Thr	Gly	Val	Val	His	Ala	Thr	Val	Leu	Ala	Thr	Val	Ala	Phe	Thr	Ala	Gly	Phe	Thr	Leu	Ala	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gly	Ala	Ser	His	20		
CUA	UGG	GGG	GUG	GUC	CAU	GGG	GCC	ACC	GUC	UUC	CUC	Pro	ACG	GGU	GUG	UUU	GGG	ACC	GCC	UCC	UUA	CUG	GGG	GCC	UUG	CAG	CEU	AGC	His	160	
Thr	Ala	Asp	Glu	Glu	Gln	Ala	Ile	Leu	Gly	Val	Pro	Trp	Lys	Asp	Lys	Asn	Cys	Thr	Ser	Arg	Leu	Asp	Ala	His	Lys	Val	Leu	Ser	Ala	50	
ACA	CGC	GAC	GAG	CUA	GCA	GCA	AUG	GGU	GUU	CUC	UGG	AAG	GAC	AAG	AAC	UGC	ACC	UCC	CGG	GUG	GAU	GGC	CAC	AAG	GUC	CUG	UUC	GCC	40		
Gln	Ala	Val	Gln	Gly	Leu	Val	Ala	Gln	Gly	Ala	Gln	Ala	Gln	Ala	Gln	Leu	Leu	Ser	Thr	Val	Val	Gly	Val	Phe	Thr	Ala	Thr	Ala	180		
CUG	CAG	CEU	GUA	CAG	GGC	CUG	CUA	GUG	GCC	CAG	GCG	AGG	CEU	GAU	AGC	CAG	GCC	CAG	CUG	CUG	CUG	UCC	ACG	GUG	GUG	GGC	GUG	UUC	ACA	540	
Ala	Pro	Gly	His	Leu	His	Lys	Gln	Pro	Phe	Val	Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Tyr	Thr	Pro	Val	Val	Leu	Pro	Arg	Ser	Leu	Asp	Phe	Thr	Ala	610	
GCC	CCA	GGC	CAC	CAG	CAC	CUG	ARG	CAG	CEU	UGU	CUG	GAC	GCC	CUG	GCC	UUA	ACC	CEU	GUG	GUC	CUG	CEA	GCG	UCU	CUG	GAC	UUC	ACA	GAA	210	
Leu	Asp	Val	Ala	Ala	Gly	Lys	Ile	Asp	Arg	Phe	Met	Gln	Ala	Val	Thr	Gly	Trp	Lys	Thr	Gly	Cys	Ser	Leu	Met	Gly	Ala	Ser	Val	Asp	240	
CEU	GAU	GUU	CEU	CEU	GAC	AAG	AUU	AGC	AGG	UUC	AUG	CAG	CEU	GAG	ACA	GGA	UGG	AAG	ACU	GCG	UGC	UUC	UUG	AGA	GGA	GCC	AGU	CUG	GAC	370	
Ser	Thr	Leu	Ala	Phe	Asn	Thr	Tyr	Val	Gly	His	Phe	Gln	Gly	Lys	Met	Lys	Gly	Phe	Ser	Leu	Ala	Glu	Pro	Gln	Glu	Phe	Trp	Val	Asp	270	
CGC	ACC	CUC	CEU	UUC	AAC	ACC	UUC	GUC	CEU	CAR	GGG	ARG	AAG	GCG	UUC	UCC	CUC	CSP	GCG	GCC	CGC	CGC	GAC	CEU	GAG	UUC	UGG	GUG	GAG	310	
Asn	Ser	Thr	Ser	Val	Ser	Pro	Met	Leu	Pro	Met	Lys	Met	Gly	Thr	Phe	Gln	His	Thr	Arg	Cys	Arg	Ile	Gln	Asp	Asn	Phe	Ser	Val	Thr	Gln	300
AAC	AGC	ACC	UCA	GUG	UCU	GUU	CCC	AUG	CUC	UCU	GGG	AUG	GCC	ACC	UUC	CAC	GAG	AGU	GAC	UUG	AGA	UCC	CAG	GAC	AAC	UUC	UUC	GUG	CAU	ACA	900
Val	Pro	Gln	Thr	Glu	Ser	Ala	Cys	Leu	Leu	Ile	Gln	Pro	His	Tyr	Ala	Ser	Asp	Leu	Asp	Lys	Val	Glu	Gly	Leu	Thr	Gln	Gln	Ala	190		
CUG	CCC	UUC	ACU	GAC	AGC	GCC	UUC	CUC	CEU	UUC	CAG	CEU	CAC	UAU	GCC	UCU	CAC	CUG	GAC	ARG	GUG	GAG	GGU	CUC	ACU	UUC	CAG	CAA	490		
Asn	Ser	Leu	Asn	Trp	Met	Lys	Lys	Leu	Ser	Pro	Arg	Thr	Ile	His	Leu	Thr	Met	Pro	Gln	Leu	Val	Leu	Gln	Gly	Ser	Tyr	Asp	Leu	Thr	160	
AAC	UUC	CAU	ACC	AAG	UGG	AUG	AAA	CUC	UCU	CCC	CGG	ACU	AUC	CAC	UCC	ACC	CCC	CA	UUG	CUG	CIN	GAA	CGA	UGU	UAU	CAG	CUG	CAG	180		
Asp	Leu	Ala	Gln	Ala	Glu	Leu	Pro	Glu	Ile	Leu	His	Thr	Glu	Leu	Asn	Leu	Gln	Lys	Leu	Ser	Asn	Asp	Arg	Ile	Arg	Val	Gly	Glu	190		
GAC	CUG	CUC	GCC	CAC	GAU	CUG	CCC	GCC	AAU	CUG	CA	ACC	GAG	CUG	AAC	CUG	CA	AAA	UGG	AGC	AUA	GAC	CGC	AUC	AGG	GUG	GGG	GAG	110		
Val	Leu	Asn	Ser	Ile	Phe	Phe	Glu	Leu	Glu	Ala	Asp	Glu	Arg	Glu	Pro	Glu	Ser	Thr	Gln	Gln	Leu	Asn	Lys	Pro	Glu	Val	Leu	Gly	420		
CUG	GUG	ACC	AGC	AUU	UUU	UUU	GGG	CUG	GAA	GGC	GAU	GAG	AGG	ACA	GAG	CEU	ACC	CAA	CUG	UUC	ACC	AAG	CEU	GAG	GUU	GUG	GUU	GAG	1260		
Val	Thr	Leu	Asn	Arg	Pro	Phe	Phe	Ala	Val	Tyr	Asp	Gln	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	His	Phe	Met	Gly	Arg	Val	Ala	Asn	Pro	Leu	Ser	450		
CUG	ACC	CUG	AAC	CGC	CCA	UUC	CUG	UUU	CEU	GUG	UAU	GAU	CAA	AGC	GCC	ACU	GCC	CUC	CAC	UUC	GCG	CGC	GUG	GCC	ACC	CEG	CUG	AGC	1450		
Thr	Ala	GCA	UGA	GGCCAGGGCC	CCAGAACAGUGC	CUGGCAGGGCCUUCGCCC	UGGCUUGAGGCAAGGCCAGCAGCAGAUAAAC	CCCCGACAAUACAGCGAUGUGUAC	CCCC	1386																					
CAGUUCUCC	ACCUUUUUCUUAUGAGUGGACU	UUUGAGGUGUAAGC	ACCGUUUUUUCUUGGUGUUAAGUGUAGUGUAGUGAGUGAGUAGUGAGCCUCCAGCGGCACAAUUGACU	1585																											
CCGAGUUUGUGGGGUUUUUUUGAGGAUUGGGGUGGGGAGGC	CAGUAGAC	CAGUUUUUGUGCGGCGACU	CUUUUUUUGUUAUU																												

Abb.24: Aminosäuresequenz des Angiotensinogens

//// Mögliche Translation-Initiation-Stellen

☐ Angiotensin I

— Glykosylierungsstellen

Unabhängig davon ob die Aminosäuresequenz des Preangiotensinogens mit dem ersten oder mit dem zweiten AUG-Kodon anfängt, besteht der aminoterminal Bereich des Preangiotensinogens in beiden Fällen aus einer Reihe hydrophober Aminosäuren, die charakteristisch für sekretorische Proteine sind. Deswegen könnten die beiden, die 24 und die 33 Aminosäuren langen Peptide, als Signalpeptide funktionsfähig sein. Die Möglichkeit, daß Angiotensinogen aufgrund einer alternativen Translation-Initiation-Stelle als ein nichtsekretorisches Protein synthetisiert werden kann, ist daher ausgeschlossen.

Diese ersten 24 bzw. 33 Aminosäuren, die für die Sekretion verantwortlich sind, werden vom Preangiotensinogen vor dem Glycin (Aminosäureposition 1 des Angiotensinogens) abgespalten.

Renin spaltet Angiotensinogen nach der Aminosäure Nr. 10 in Angiotensin I (AMCS 1-10) und ein 442 AMCS-großes Restprotein (sogenanntes des-Angiotensin I Angotensinogen).

Das menschliche Angiotensinogen weist potentielle Glykosylierungsstellen an den Positionen 14-16, 137-139 und 295-297 auf (Abb. 24). Sie befinden sich mitten in Exons und werden daher durch alternative Spleißprozesse nicht angegriffen.

2.3.1. Vergleich zwischen der AMCS-Sequenz des Angiotensinogens von Ratte und Mensch

Die primäre Aminosäuresequenz des Ratten-Preangiotensinogens wurde von der Nukleotidsequenz der mRNA abgeleitet (Ohkubo et al., 1983). Ein Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen Ratte und Mensch hat 63.6% Homologie ergeben. Wenn man den Vergleich erweitert und nur die Zugehörigkeit der Aminosäuren zu der hydrophoben, polaren basischen oder polaren sauren Gruppe zugrunde legt, steigt die Homologie auf 80%. Von den drei Aminosäuregruppen zeigen die hydrophoben Aminosäuren eine höhere Konservierungsstufe (82%) als die polaren sauren (70%) oder die polaren basischen (65%) Aminosäuren.

Prolin und Glycin, die oft in einem "Beta-Turn" vorkommen, sind zwischen den beiden Angiotensinogenen hoch konserviert: 20 von 23 Prolinen haben dieselbe Aminosäureposition (Kageyama et al., 1984).

Renin spaltet das menschliche Angiotensinogen zwischen der Bindung Leu-Val, während bei der Ratte und bei den anderen Säugetieren die Leu-Leu-Bindung gespalten wird (Skeggs et al., 1957; Tewksbury et al., 1979). Ein Vergleich der Aminosäuresequenz der zwei Angiotensinogene

zeigt weiter, daß die aminoterminalen Bereiche direkt hinter dem Angiotensin I-Teil eine sehr niedrige Homologie zueinander aufweisen.

Die Glykosylierungsstelle, die der Sequenz Asn-X-Thr entspricht, befindet sich beim Menschen an der Aminosäureposition 14-16, während sie bei der Ratte an der Position 23-25 lokalisiert ist.

Das menschliche Angiotensinogen kann nur durch das menschliche oder Primaten-Renin gespalten werden, während das Ratten-Angiotensinogen durch fast alle Säugetier Renine gespalten wird (Kageyama et al., 1984).

2.3.2. Vergleich zwischen Angiotensinogen und α_1 -Antitrypsin

Die Exons mancher eukaryontischer Gene, z.B. von Immunoglobulinen (Sakano et al., 1979) und Globinen (Go, 1981), kodieren für Aminosäuresequenzen, die separate strukturelle und funktionelle Domänen der Proteine bilden (Gilbert, 1978; Blake, 1983). Die Behauptung, daß Angiotensinogen und α_1 -Antitrypsin ähnliche biologische Funktionen haben wird daher nicht nur durch die Nukleotidsequenz Homologie, sondern auch durch die homologe Intron-Exon-Verteilung in beiden Genen unterstützt.

Alpha₁-Antitrypsin, Antithrombin III, und alpha₁-Antichymotrypsin sind Proteinase Inhibitoren, mit unterschiedlichen Inhibitor Konstanten (Travis und Salvesen, 1983). Die aktiven Stellen dieser drei Inhibitoren sind an homologen Stellen des Carboxyl-Endes lokalisiert. Die Aminosäuren, die die für die Inhibition wichtige Domäne umgeben, sind hoch konserviert, während die zu den entsprechenden Proteinasen komplementären Epitope bei den drei Proteinase-Inhibitoren natürlich völlig verschieden sind. Sowohl alpha₁-Antitrypsin wie alpha₁-Antichymotrypsin zeigen auch volle enzymatische Aktivität, wenn 9-15 Aminosäuren vom Aminotermi- nus abgespalten werden (Morii und Travis, 1983).

Ein Aminosäuresequenz-Vergleich des alpha₁-Antitryp- sins mit dem Angiotensinogen zeigt einen erheblichen Verwandtschaftsgrad der zwei Proteine in carboxytermi- nalen Bereichen, während die aminoterminalen Bereiche keine Homologie zeigen (Doolittle, 1983), (Abb.25). Alle diese Tatsachen erlauben die Spekulation, daß das bei der Bildung von Angiotensin II abgespaltene des- Angiotensinogen ebenfalls eine inhibitorische Funktion auf eine Serine Proteinase ausüben könnte.



Abb.25. Vergleich zwischen Struktur und Aminosäuresequenz des Angiotensinogen- und α_1 -Antitrypsin Gene.

Identische Aminosäuren sind durch senkrechte, die beiden Gene verbindende Linien gekennzeichnet.

(Tanaka et, al., 1984).

-  5'- und 3'-untranslatierte Regionen
-  Signalsequenz
-  Position des Angiotensins I und des von α_1 -Antitrypsin abgespaltenen Peptides
-  Position der Introns

IV. DIE INTRAZELLULÄRE ANGIOTENSIN II-WIRKUNG.

Obwohl noch nicht endgültig geklärt ist, wie Angiotensin II seine Wirkung jenseits seines Rezeptors propagiert, deuten neueste Ergebnisse darauf hin, daß das Angiotensin II-Signal über den sg. IP_3 -Weg (Garrison et al., 1979; Alexander et al., 1979; Farese et al., 1981; Baudouin et al, 1972) weitervermittelt wird.

Bei dem IP_3 -Signalweg ändert der Rezeptor, der ein Hormon gebunden hat, seine Konformation und aktiviert dadurch ein benachbartes, membrangebundenes Protein, das sog. G-Protein, das seinerseits ein Phosphat aus dem Zellinneren bindet (vom GTP). Ein durch Phosphorylierung aktiviertes G-Protein aktiviert die Phosphodiesterase, die daraufhin das Lipid Phosphatidylinosit-4,5-diphosphat (PIP_2) in das Inosittriphosphat (IP_3) und Diglycerid (DG) spaltet.

IP_3 ist wasserlöslich und kann daher ungehindert in das Plasma diffundieren. Dort löst es die Freisetzung von Calcium-Ionen aus, welche in einem vernetzten Membranlabyrinth, dem endoplasmatischen Retikulum, gespeichert sind. Die ausgeschütteten Calcium-Ionen binden an den Ca-Ionen-Rezeptor Calmodulin. Der Ca-Ionen-Calmodulin-Komplex bildet zusammen mit einem weiteren Protein ein Enzym (Myosin-Light-Chain-Kinase), welches in der

Lage ist, das leichte Myosin zu phosphorylieren. Myosin ändert daraufhin seine Konformation, wodurch dem Aktin ermöglicht wird, die ATP-ase des Myosins zu aktivieren, und dadurch das Zusammenziehen eines Fibrils zu bewirken, welches bekannterweise auch in den juxtaglomerulären Zellen vorhanden ist (Williamson, 1986), (Abb.26).

Aus den in Kapitel II besprochenen Möglichkeiten der intrazellulären Angiotensin II-Bildung und der oben besprochenen Angiotensin II-Wirkung lassen sich zwei modellhafte Vorstellungen der intrazellulären Angiotensin II-Wirkung aufstellen.

Das erste Modell geht von Angiotensin II, das frei im Cytosol gebildet wird, aus. In diesem Fall entfaltet Angiotensin II seine Wirkung durch die Bindung an Angiotensin II-Rezeptoren, die an den Mitochondrien und den Nuklei lokalisiert sind (Goodfried et al., 1972; Re et al., 1984).

Im zweiten Modell geht man davon aus, daß Angiotensin II in den Lysosomen gebildet wird. Die Frage, wie ein in einem Lysosom eingeschlossenes Angiotensin II Zugang zu den für seine Wirkung notwendigen Rezeptoren findet, läßt zwei Möglichkeiten offen.

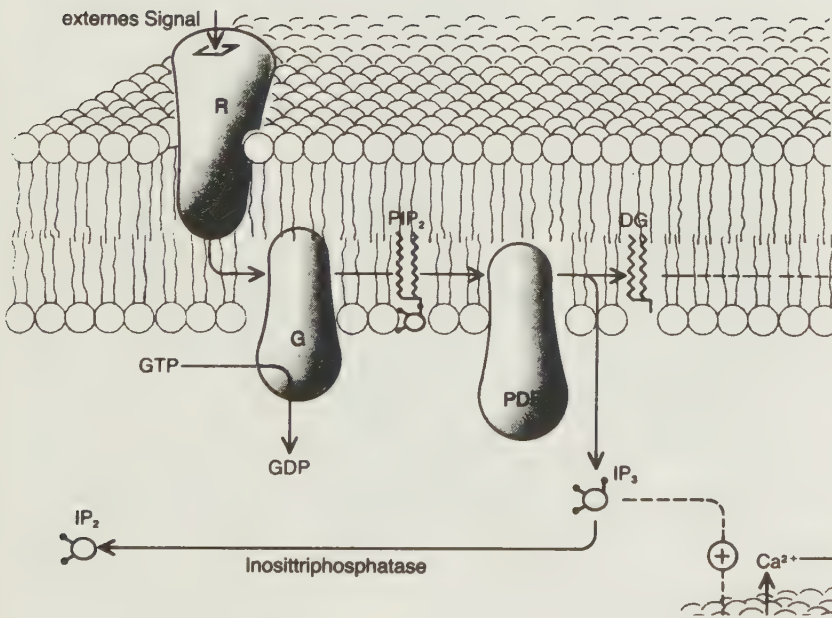


Abb.26: Signalübertragung in die Zelle (Berridge,1985).

Als erstes kann man annehmen oder zumindest nicht ausschließen, daß Angiotensin II-Rezeptoren auch in der Membran von Lysosomen vorkommen. In diesem Fall würde die Angiotensin II-Signalübertragung derjenigen, durch die Zelloberflächen-Rezeptoren übermittelten Wirkung entsprechen.

Die zweite Möglichkeit ergibt sich aus einer Beobachtung, die bei der Untersuchung der Morphologie der Renin-Sekretion gemacht wurde.

Bei einem durch Glycerol, Quecksilberchloride oder Uraniumnitrat hervorgerufenen akuten Nierenversagen kommt es in den juxtaglomerulären Zellen zur Bildung von tiefen, tunnelähnlichen Invaginationen der Oberflächenmembran (Abb.26). Diese Invaginationen erreichen die amorphen Renin-Vesikel und verschmelzen mit ihnen. Eine Polarität der Kanäle konnte nicht beobachtet werden; sie entstehen rund um die Zelle (Peter, 1976; Barajas, 1966), (Abb.27).

Dieser Vorgang wurde als eine ungewöhnliche Art der Exocytose interpretiert: anstatt der üblichen Bewegung der sekretorischen Vesikel zu der Oberflächenmembran bewegt sich die Oberflächenmembran zu den Vesikeln. Mit der Invagination der Membran werden aber auch die Angiotensin II-Rezeptoren dorthin gebracht, wo sie

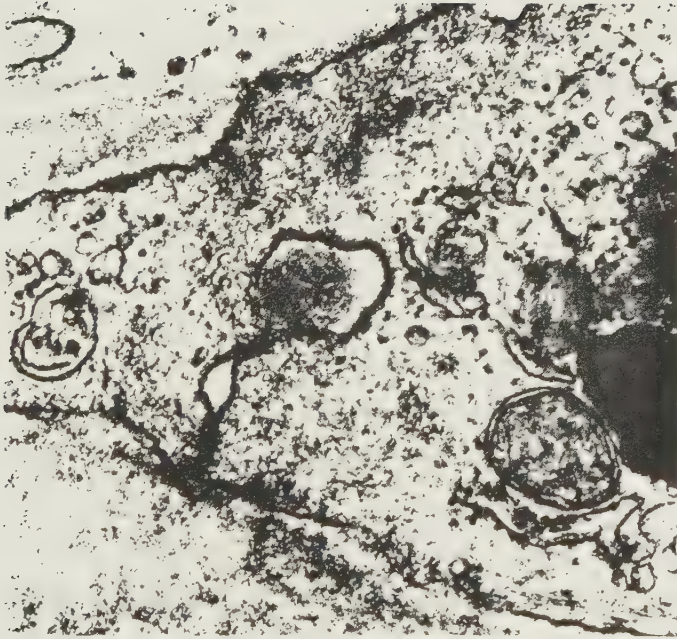


Abb.26: Myoepitheloide Zelle einer Ratte mit einem akuten Nieren-Versagen, zwei Stunden nach Zugabe von Glycerol. Eine tiefe, tunnelähnliche Inva-
gination der Membran verbindet das Vesikel
(Stern) mit der Zelloberfläche (Ryan, at al.,
1982).

Angiotensin II nun erreichen können oder sogar erreichen müssen. Das an Rezeptoren ungebundene Renin und Angiotensin II findet dann seinem Weg nach außen, was die erhöhte Renin-Konzentration bei einer künstlich hervorgerufenen Aktivierung des lokalen Renin-Angiotensin-Systems erklären könnte.

V. DISKUSSION

Es ist heute allgemein bekannt, daß im Falle eines akuten Nierenversagens das tubuloglomeruläre Feedbacksystem aktiviert wird, was zur Verminderung der glomerulären Filtrationsrate führt und einen lebensbedrohlichen Flüssigkeitsverlust verhindert. Ein akutes Nierenversagen wird durch die plötzliche und drastische Verminderung der Resorptionsfähigkeit der Tubuluszellen herbeigeführt und durch eine erhöhte NaCl-Konzentration im distalen Tubulus manifestiert. Diese erhöhte NaCl Konzentration wird von spezialisierten Zellen des distalen Tubulus, den Macula densa-Zellen, wahrgenommen und als Signal an die myoepitheloiden Zellen der afferenten Arteriole weitergeleitet. Von der Stärke dieses Signals hängt die lokale Bildungsrate des vasoaktiven Angiotensin II ab, welches die Kontraktion der afferenten Arteriole und dadurch die Änderung der glomerulären Filtrationsrate bewirkt.

Die lokale Bildung und Wirkung des Angiotensin II und seine Rolle als Effektor des tubuloglomerulären Feedbacksystems erscheint unbestritten. Über den genauen

Ort der lokalen Angiotensin II-Bildung, die limitierenden Faktoren seiner Synthese-Rate und über den Mechanismus seiner lokalen Wirkung wird vorläufig noch in verschiedenen Hypothesen formuliert. Die in dieser Arbeit untersuchte Hypothese besagt, daß Angiotensin II in den myoepitheloiden Zellen gebildet wird und dort seine Wirkung ausübt.

Das zentrale Problem dieser Hypothese liegt darin, daß Angiotensinogen und Renin offenbar durch ihren genetischen Code sekretorische Proteine sind und folglich ihre Wirkung nur außerhalb der Zelle und nicht in deren Cytosol entfalten sollten. Es blieb daher zu untersuchen, ob Angiotensinogen und Renin auch in einer nicht-sekretorischen Form synthetisiert werden könnten.

Beispiele für Gene, die von dem genetischen Dogma "ein Gen - ein Protein" abweichen, sind inzwischen bekannt. Mehrere Transkription-Initiation-Stellen eines Gens, alternative Spleißstellen einer mRNA und verschiedene Modifikationsprozesse an einem Protein können dazu führen, daß ein Gen für zwei Formen eines Proteins oder sogar für völlig verschiedene Proteine kodiert.

Die Tatsache, daß in der submandibulären Drüse der Maus zwei verschieden lange Renin-mRNA-Populationen identifiziert wurden, zeigt mindestens die Möglichkeit einer alternativen Renin-Gen-Expression.

Durch welche Prozesse diese mRNA-Variabilität zustande kommt und ob sie dann tatsächlich zu zwei Renin-Formen mit verschiedener zellulären Lokalisation führt, ist vorläufig noch nicht untersucht worden.

Die Möglichkeit, daß eine Renin-mRNA Variabilität durch Benutzung zusätzlicher Transkription-Initiation-Stellen entsteht, ist grundsätzlich vorhanden. In der 5'-Region des Renin-Gens und in dem ersten Intron befinden sich Hogness-Boxen, die die Transkription des Renin-Gens von alternativer Stelle aus bewirken könnten. Benutzung dieser zusätzlichen Transkription-Initiation-Stellen würde zur Synthese von einem Renin führen, bei welchem die Signalsequenz entweder nicht am Aminoende liegt oder überhaupt nicht vorhanden ist. Solch ein Renin würde in der Zelle verbleiben und im Cytosol die Spaltung am Angiotensinogen vornehmen. Eine Längenvariabilität wurde auch bei der Angiotensinogen-mRNA festgestellt. Die Tatsache jedoch, daß die Angiotensinogen-mRNA am 5'-Ende aus einem 6000-Nukleotide-langen, untranslatierten Bereich besteht, vermindert die Chancen, daß eine alternative Transkription-Initiation-Stelle eine Änderung des Aminoendes am Angiotensinogen bewirken könnte.

Eine weitere Variabilität der durch ein Gen kodierten

Proteine kann durch einen alternativen mRNA-Spleiß-Prozess erreicht werden. Im Renin-Gen kodiert das erste Exon die Signalsequenz und Teile der Prosequenz. Eine Elimination des ersten Exons und dadurch der Signalsequenz würde daher die zelluläre Lokalisation des Renins verändern, während seine katalytische Aktivität unverändert bliebe.

Die Signalsequenz des Angiotensinogens dagegen liegt auf demselben Exon wie dessen Aminoende. Ein alternativer Spleißprozess kann daher in diesem Fall die Sekretion des Angiotensinogens nicht verhindern ohne auch gleich seine Wirkung zu zerstören. Diese Struktur alleine ist zwar kein endgültiger Beweis dafür, daß Angiotensinogen nicht doch im Cytosol synthetisiert werden könnte, macht jedoch die im Modell I (Kapitel III) vorgestellte intrazelluläre Wirkung von Angiotensin II unwahrscheinlich.

Behalten Angiotensinogen und Renin ihre Signalsequenz, so gelangen sie in den Golgi-Apparat, wo sie aufgrund noch unbekannter Strukturmerkmale entweder in das Lysosom oder in ein sekretorisches Vesikel verpackt werden. Eine Variabilität der Primärsequenz beider Proteine, die durch den alternativen, der AG/GT Regel folgenden Spleißprozess entstehen könnte, könnte solche

Strukturmerkmale eliminieren oder neue hervorbringen. Dadurch könnte ein Teil der Angiotensinogen- und Renin-Population dergestalt modifiziert werden, daß sie anstatt in ein sekretorisches Vesikel in ein Lysosom verpackt würde.

Das in den Lysosomen gebildete Angiotensin II könnte intrazellulär nur dann seine Wirkung ausüben, wenn dort Angiotensin II-Rezeptoren vorhanden wären. Eine Möglichkeit, wie das in den Vesikeln eingeschlossene Angiotensin II seine Rezeptoren erreichen könnte, ergibt sich aus der Beobachtung, daß die Zellmembran der myoepitheloiden Zellen Tunnel-ähnliche Invaginationen ausbildet, die die Renin-Vesikel erreichen und mit ihnen fusionieren. Diese besondere Art der Sekretion würde unvermeidbar Angiotensin II an seine Rezeptoren bringen, das dadurch auf eine kontrollierte und zuverlässige Art lokal seine Wirkung ausüben könnte (Modell 3).

Welche der drei vorgeschlagenen Modelle der intrazellulären Angiotensin II Wirkung wirklich zutrifft, kann nur mit weiteren Experimenten bestimmt werden.

Zurückgreifend auf die drei diese Arbeit einleitenden Fragen, ergeben sich folgende experimentelle Ansätze.

Mit den neu entwickelten Histo-hybridisierungs-Techniken und der bereits isolierten Angiotensinogen-mRNA läßt sich die lange umstrittene Frage, ob Angiotensinogen auch in den juxtaglomerulären Zellen synthetisiert wird, in endgültiger Weise beantworten. Ein negatives Resultat dieser Untersuchung bedeutet lediglich, daß Angiotensinogen nicht in den juxtaglomerulären Zellen synthetisiert wird, schließt aber nicht die intrazelluläre Bildung und Wirkung vom Angiotensin II aus. Ein positives Resultat läßt nach dem Sinn dieses Syntheseortes fragen. Mit einem spekulativen "um dort eine Wirkung ausüben zu können", ließe sich diese Frage beantworten.

Eine Quantifizierung der Renin- und g.g.f. Angiotensinogen-mRNA in den juxtaglomerulären Zellen würde einen Aufschluß über den limitierenden Faktor des tubuloglomerulären Feedback-Systems geben. Darüber hinaus wäre eine Demonstration einer direkten Beziehung zwischen der NaCl-Konzentration im Macula densa-Segment und der Renin- und Angiotensinogen-mRNA-Konzentration in den Juxtaglomerulären Zellen ein direkter Beweis, daß die Aktivierung des tubuloglomerulären Feedback-Systems durch eine Änderung der NaCl-Konzentration erfolgt.

In einer zweiten experimentellen Etappe müßte man neben der bereits gezeigten Längenvariabilität der Renin- und Angiotensinogen- mRNA deren Verteilung und Vorkommen nachgehen. Die Renin- und Angiotensinogen- mRNAs müßten aus den juxtaglomerulären Zellen isoliert werden, die Tieren entstammen, bei denen ein physiologischer Zustand, der zur Aktivierung des tubulglomerulären Feedback-Systems führt, künstlich herbeigeführt wurde. Durch Sequenzanalyse zumindest der 5'-Enden der kürzeren mRNA Populationen könnte man zeigen, ob diese durch eine alternative Transkription-Initiation-Stelle oder durch einen alternativen Spleiß-Prozesses entstanden sind, und ob dabei, wie vermutet, die Signalsequenz verloren gegangen ist. Dadurch wäre die intrazelluläre Bildung und Wirkung von Angiotensin II in ein wesentlich deutlicheres Licht gerückt.

Die Möglichkeit, daß Angiotensinogen, Renin und Converting Enzyme unter bestimmten physiologischen Bedingungen in Lysosome anstatt in sekretorische Vesikel verpackt werden, kann durch Untersuchung der Renin und Angiotensin II-haltigen Vesikeln auf die für die Lysosome und sekretorische Vesikeln charakteristischen Eigenschaften erbracht werden. Diese Untersuchungen werden in der Regel mit Markern wie HRPT oder durch Identifizierung

der in den Vesikel sich befindenden sauren Phosphatase durchgeführt.

Durch die Demonstration der intrazellulären Angiotensin II-Wirkung wäre nicht nur ein wichtiger Beitrag zum besseren Verständnis der Physiologie der Niere mit sehr wichtigen Auswirkungen auf medizinische Fragestellungen vollbracht, sondern ebenfalls die Erforschung eines interessanten hormonellen Systems auf molekularbiologischer Ebene gelungen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde die Hypothese der intrazellulären Angiotensin II-Wirkung als Effektor des tubuloglomerulären Feedbacksystems untersucht. Immunochemische Arbeiten, die die an der Angiotensin II-Bildung beteiligten Komponenten in den juxtaglomerulären Zellen identifiziert haben, unterstützen die Hypothese eines intrazellulären Renin-Angiotensin-Systems. Dafür spricht weiterhin die Tatsache, daß sowohl Renin als auch Angiotensinogen zusätzlich zu ihren sekretorischen Formen auch als nichtsekretorische Proteine synthetisiert werden könnten, d.h. sie würden in der Zelle verbleiben und dort ihre Wirkung ausüben. Dies wäre im Fall von Renin durch Benutzung von alternativen Transkription-Initiation-Stellen oder durch einen alternativen Spleißprozess möglich, die die Signalsequenz eliminieren würden. Beim Angiotensinogen ist diese Möglichkeit nicht eindeutig vorhanden. Ein alternativer Spleißprozess könnte bewirken, daß Angiotensinogen obwohl mit der Signalsequenz, so modifiziert ist, daß es statt in ein sekretorisches Vesikel in ein Lysosom verpackt würde. Wie intrazelluläres Angiotensin II die Angiotensin-II-Rezeptoren erreichen könnte, wird anhand von drei Modellen diskutiert.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Alwine, J.C., Kemp, D.J., Stark, G.R., 1977
Method for detection of specific RNAs in agarose by
transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridi-
sation with DNA probes.
PNAS, 74:5350-5354
- Amara, S., 1982
Jonas, V., Rosenfeld, M., Ong, E., Evans, R.:
Alternative RNA processing in calcitonin gene
expression generates mRNAs encoding different
polypeptide products.
Nature, 298: 240-244
- Angerer, L.M., Angerer, L.C.: 1981
Detection of poly⁺A RNA in sea urchin eggs and
embryos by quantitative in situ hybridisation.
NAR, 9: 2819-2840
- Baudouin, M., 1972
Mayer, P., Fermandjian, S., Morgat, J.L.,
Calcium release induced by interaction of angiotensin
with its receptors in smooth muscle cell microsomes.
Nature, 235:336-338

- Barajas, L.: 1966
The development and ultrastructure of the juxta-glomerular cell granule.
J.Ultrastruc.Res, 15:400-413
- Baines, A.D., Basmadijan D., Wang, C.: 1979
Computer simulation of flow dependant absorbtion in mikroperfused short Henley`s loop of rats.
Biophys. J., 27: 21-38
- Beach, L.R., Palmiter, R.D.: 1981
Amplification of the metallothionein-I gene in cadmium-resistant mouse cells.
PNAS, 78: 2110-2114
- Berridge, M.J., 1985
Die Signal Übertragung in die Zelle.
Spektrum der Wissenschaft, 12, pp.
- Billah, M.M., Michell, R.H.: 1979
Phosphatidylinositol Metabolism in Rat Hepatocytes Stimulated by Glycogendylic Hormones.
Biochem. J., 182: 661-668

- Bing, J., 1980
Poulsen, K., Hackenthal, E., Rix, E., Taugner, R.:
Renin in the submandibular gland.
J. Histochem. Cytochem., 28: 874-880
- Blake, C. 1983
Exons - present from the beginning?
Nature, 306: 535-537
- Brahic, M., Haase, A., 1978
Detection of viral sequences of low reiteration
frequency by in situ hybridization.
PNAS, 75: 6125-6129
- Bloch B., Milner, R., Baird, A., Gubler, U., 1984
Reymond, C., Bohlen, P., Le Guellec, D., Bloom, F.:
Detection of the mRNA coding for preproenkephalin A
in bovine adrenal by in situ hybridisation.
Regulatory peptides, 8: 345-354
- Breatnach, R., 1978
Benoist, C., O'Hare K., Gannon, F., Chambon, P.:
Ovalbumin Gene: Evidence for a leader sequence in
mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries.
PNAS, 75: 4853-4857

- Breathnach, R., Chambon, P.: 1981
Organization and Expression of Eukaryotic Split Genes
Coding for Proteins.
Ann. Rev. Biochem., 50: 349-383
- Briggs, J.P., Schnermann, J.: 1980
Failure of tubule fluid osmolarity to affect feedback
regulation of glomerular filtration.
Am. J. Physiol., 239: F427-F432
- Briggs, J.P., Schubert, G., Schnermann, J.: 1982
Further evidence for inverse relationship between
macula densa NaCl concentration and filtration rate.
Pfluegers Arch., 392: 372-378
- Burghardt, W., Schweisfurth, H., Dalheim, H. 1982
Juxtaglomerular angiotensin II formation.
Kidney International, Suppl. 12: 49-54
- Cantazaro, D., Mullins, J.J., Morris, B., 1983
The biosynthetic pathway of Renin in mouse SMG
Journal of biol. chem., 258: 7364

- Celio, M., Inagami, T., 1981
Angiotensin II immunoreactivity coexists with renin
in the juxtaglomerular cells of the kidney.
Proc. Natl. Acad. Sci., 78: 3897-3900
- Chirgwin, J., 1984
M., Schaefer, J., M., Rotwein, P.S., Piccini, N.,
Gross, K.W., Naylor, S.L.:
Human renin gene is on chromosome 1.
Somatic Cell and Molecular Genetics, 10: 415-421
- Coghlan, J.P., 1984
Penchow, J.D., Hudson, P.J., Niall, H.D.:
Hybridization histochemistry: use of recombination
DNA for tissue localization of specific mRNA
populations.
Clin. Exp. Hypertension Theory Prac., A6: 6378
- Crane, J.K., Campanile, C.P., Garrison, J.C., 1982
The Hepatic Angiotensin II Receptor.
The Journal of Biological Chemistry, 257: 4959-4965

- Darby, I.A., 1985
Aldred, P., Crawford, R.J., Fernley, R.T., Niall,
H.D., Penschow, J.D., Ryan, G.B., Coghlan, J.P.:
Renin gene expression in vessels of the ovine renal
cortex.
Journal of Hypertension, 3: 9-11
- De Pierre, D., Poth, M.: 1975
Fluorimetric determination of dipeptidyl carboxy-
peptidase.
Enzyme, 19: 65-70
- Dev, B., Drescher, C., Schnermann, J.: 1974
Ressetting of tubuloglomerular feedback sensitivity by
dietary salt intake.
Pfluegers Arch., 346: 262-277
- Dierks, P., 1983
Van Ooyen, A., Cochran, M.D., Dobkin, C., Reiser, J.,
Weissman, C.:
Three Regions Upstream from the Cap Site Are Required
for Efficient and Accurate Transcription of the
Rabbit Beta Globin Gene in Mouse 3T6 Cells.
Cell, 32: 695-706

- Doolittle, R.F.: 1983
Angiotensinogen Is Related to the Antitrypsin-
Antithrombin Ovalbumin Family.
Science, 222: 417-419
- Edwards, R., Selby, M., Rutter, W.: 1986
Differential RNA Splicing predicts two distinct nerve
growth factor precursors.
Nature, 319: 784-787
- Falkenthal, S., Parker, V., Davidson, N.: 1985
Developmental variations in the splicing pattern of
transcripts from the Drosophila gene encoding myosin
alkali light chain result in different carboxyl-
terminal amino acid sequence.
Proc. Natl. Acad. Sci.
- Farese, R.V., 1981
Larson, R.E., Sabir, M.A., Gomez-Sanches:
Effects of Angiotensin II and Potassium on
Phospholipid Metabolism in the Adrenal Zona
Glomerulosa.
J. Biol. Chem., 256: 11093-11097

Field, L.J., 1984a

McGowan, R.A., Dickinson, D.P., Gross, K.W.

Tissue and gene specificity of mouse renin expression.

Hypertension, 6: 597-603

Field, L.J., 1984

Philbrick, W.M., Howles, P.N., Dickinson, D.P., Mc

Gowan, R.A., Gross, K.W.:

Expression of tissue-specific Ren-1 and Ren-2 genes
of mice: comparative analysis of 5'-proximal
flanking Regions.

Mol. Cell. Biol., 4: 11

Francisco, L.L., Sawin, L.L., Di Bona, G.F.: 1982

On the signal for activation of tubuloglomerular
feedback.

J. Lab. Clin. Med., 99: 722-730

Garrison. J.C., 1979

Borland, M.K., Florio, V.A., Twible, D.A.:

The Role of Calcium Ion as a Mediator of the Effects
of Angiotensin II, Catecholamines, and Vasopressin on
the Phosphorylation and Activity of Enzymes in
Isolated Hepatocytes.

J. Biol. Chem., 254: 7147-7156

- Gerhard, D., 1981
Kawasaki, E. S., Bancroft, F. C., and Schabo, P.
Lokalisation of a unique gene by direct hybridization
in situ
PNAS 78: 3755-3759
- Gertz, K.H., Mangos, J.A., Braun, G., Pagel, H.: 1966
Pressure in the glomerular capillaries of the rat
kidney and its relation to arterial blood pressure.
Pflügers Arch., 288: 369-374
- Gillespie, D., Spiegelman, S.: 1965
A Quantitative Assay for DNA-RNA Hybrides with DNA
immobilized on a Membrane.
J. Mol. Biol., 12: 829-842
- Gillies, A., Morgan, T.: 1982
Activity of renin in the juxtaglomerular apparatus.
Kidney International, 22 (Supp. 12): 67-72
- Gilbert, W.: 1978
» Why genes in pieces?
Nature, 271: 501

- Go, M.: 1981
Correlation of DNA exonic regions with protein
structural units in haemoglobin.
Nature, 291: 90-92
- Gocke, D.J., 1968
Sherwood, L., Oppenhoff, J., Gerten, J., Laragh, J.:
Measurment of plasma angiotensin II and correlation
with renin activity.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 28: 1675-1678
- Goodfried, T.L., Fyhrquist, F., Gutmann, F.: 1972
Clinical and conceptual uses of angiotensin
rezeptors, in Genest, J., Koiw, E., (eds):
Hypertension 72, New York, Springer Verlag N.Y.Inc.,
pp. 549-563
- Granger, P., Dalheim, H., Thureau, K.: 1972
Enzyme activities of the single juxtaglomerular
apparatus in the rat kidney.
Kidney International
- Grundstein, M., Hogness, D.A.: 1975
Colony Hybridisation: A Method for the isolation of
cloned DNAs that contain a specific gene.
PNAS, 72: 3961-3965

- Haber, E., 1969
Koerner, T., Page, L., Kliman, B., Purnode, A.:
Applikation of a radioimmunoassay for Angiotensin I
to the physiologic measurments of plasma renin
activity in normal human subjects.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 29: 1349-1355
- Harrison, P.R., Conkie, D., Paul, J., Jones, K.: 1973
Lokalisation of cellular globin mRNA by in situ
hybridization to complementary DNA.
FEBS Letters, 32: 109
- Harth, O., 1985
in Physiologie des Menschen, Nierenfunktion,
herausgegeben von Schmidt, R.F., Thews, G., Springer
Verlag.
- Hendy, N., Kronberg, M., Potts, T., Rich, A.: 1981
Nucleotide sequence of cloned cDNAs encoding human
preproparathyriod hormone.
PNAS, 78: 7365-7369

- Hirose, S., 1983
Yamamoto, M., Kim, S., Tsuchiya, M., Murakami, K.:
Localization of renin mRNA in the mouse submandibular
gland by in situ hybridization.
Biomedical Research, 4: 591-596
- Hobart, P.M., 1984
Fogliano, M., O'Connor, A., Schaefer, M., Chirgwin, M.
Human renin gene: structure and sequence analysis.
PNAS, 81: 5026-30
- Holm, J., Ollo, J., Panthier, J., Rougeon, F.: 1984
Evolution of asparatyl protease by gene duplication:
The mouse renin gene is organised in two homologous
clusters of four exons.
EMBO J., 3: 557-562
- Hudson, P., Penschow, J., 1981
Shine, J., Ryan, G., Niall, H., Coghlan, J.
Hybridization histochemistry: use of recombinant DNA
as a "homing" probe for tissue localisation of
specific mRNA population.
Endocrinology, 108: 353

- Imai, T., 1983
Miyazaki, H., Hirose, S., Hori, H., Hayashi, T.,
Kageyama, R., Ohkubo, H., Nakanishi, S., Murakami, K.
Cloning and sequence analysis of cDNA for human renin
precursor.
PNAS, 80: 7405-7409
- Inagami, T., 1980
Murakami, K., Yokosawa, K., Matoba, T.,
Yokosawa, N., Takii, Y., Misono, K.:
In Gross, F., and Fogel, H.F.(eds.), Enzymatic
Release of Vasoactive Peptides, Raven Press, NY,
pp.7-30
- Inagami, T., Chang, J.J., 1983
Dykes, C.W., Takii, Y., Kisaragi, M., Misono, K.S.:
Renin: structural features of active enzyme and
inactive precursor.
Fed. Proc., 42: 2729-2734
- Inagami, T.: 1981
Renin in Soffer RL, ed. Biochemical regulation of
blood pressure. New York: John Wiley and Sons, 1981:
39-71.

Jay, G., Nomura, S., Anderson, W., Khoury, G., 1981

Identification of the SV 40 agnogene product:
a DNA binding protein.

Nature, 291: 346-349

Kageyama, R., Ohkubo, H., Nakanishi, S., 1984

Primary structure of human preangiotensinogen deduced
from cDNA.

Biochemistry, 23: 3603-3609

Kidd, J., Wallace, B., Itakura, K., Woo, S.: 1983

Alpha₁-Antitrypsin deficiency detection by direct
analysis of the mutation in the gene.

Nature, 304: 230-234

Kozak, M.: 1981

Possible role of flanking nucleotides in recognition
of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes.

NAR, 9: 5233-5252

Kunapuli, S.P., Kumar, A.: 1986

Molecular cloning of human angiotensinogen cDNA and evidence for the presence of two mRNA in the rat brain in Advances in Gene Technology: Molecular Biology of the Endocrine System, Proceedings of the 18th Miami Winter Symposium, 1986, ICSU Short Reports, Volume 4.

Kugler, P.: 1982

Histochemistry of angiotensinase A in the glomerulus and the juxtaglomerular apparatus.
Kidney International (Suppl.) 12: 44-48

Latta, H., 1973

Ultrastructure of the glomerulus and juxtaglomerular apparatus, in Handbook of Physiology, Section 8, Renal Physiology, edited by Orloff, J., Berliner RW, Washington, American Physiological Society, pp1-29.

Lawrence, J.B., Singer, R.H.: 1985

Quantitative analysis of in situ hybridisation methods for the detection of actin gene expression.
Nukleic Acid Research, 13: Nr.5

Leckie, B., Gavras, H., McGregor, J., McElwe, G., 1972
The conversion of angiotensin I to angiotensin II by
rabbit glomeruli.
J. Endocrinology, 216: 762-766

Leicht, M., 1982
Long, G.L., Chandra, T., Kurachi, K., Kidd, V.J.,
Mace, M.J., Davie, E.W., Woo, S.L.:
Sequence homology and structural comparison between
the chromosomal human α_1 -antitrypsin and chicken
ovalbumin genes.
Nature, 297: 655-659

Lewin, B. 1983
What is a Gene? A Biochemical view. in Gene
Editor: Cell, pp:39-42

Medford, R., Nguyen, H., 1984
Destree, A., Summers, E., Nadal-Ginard, B.:
A Novel Mechanism of Alternative RNA Splicing for the
Developmentally Regulated Generation of Troponin T
isoforms from a Single Gene.
Cell, 38: 415-419

Mesterovic, N., Cantazaro, D., Morris, B.: 1983

Detection of Renin mRNA in Mouse Kidney and
Submandibular Gland by Hybridisation with Renin
cDNA.

Endocrinology, 13, Nr.3

Michelakis, A.M., 1974

Yoshida, H., Menzie, J., Murakami, K., Inagami, T.:
A radioimmunoassay for the direct measurement of renin
in mice and its application to submaxillary gland and
kidney studies.

Endocrinology, 94: 1101

Miyazaki, H., 1984

Fukamizu, A., Hirose, S., Hayashi, T., Hori, H.,
Ohkubo, H., Nakanishi, S., Murakami, K.:

Structure of the human renin gene

PNAS, 81: 5999-6003

Misomo, K.S., Chang, J.J., Inagami, T.: 1982

Amino acid sequence of mouse submandibular gland
renin

PNAS, 79: 4858-4862

- Morgan, T., Davies, J., Gillies, A., 1984
Release of Renin into circulation.
Kidney international, 22, Suppl. 12, pp.63-66
- Morii, M., Travis, J.: 1983
Structural Alteration in Alpha1-Antichymotrypsin from
Normal and Acute Phase Human Plasma.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 111: 438-443
- Morris, B.J., Johnson, C.I.: 1976
Isolation of renin granules from rat kidney cortex
and evidence for an inactiv form of renin.
Endocrinology, 98: 1446-1474
- Mullins, J.J., Burt, D.W., 1982
Windass, J.D., Mc Turk, P., George, H., Brammar, W.J.,
Molecular cloning of two distinct renin-genes from the
DBA/2 mouse.
EMBO Journal, 1: 1461-1466
- Murakami, K. 1984
Hirose, S., Miyazaki, H., Imai, T., Hori, H., Hayashi,
T., Kageyama, R., Nakanishi, S.:
Hypertension, 6 (2PT2): 195-100

Nagata, S., Mantei, N., Weissman, C.: 1980

The structure of one of the eight or more distinct
chromosomal genes for human interferon-d.

Nature, 287: 401-408

Noyes, B.E., Stark, G.R.: 1975

Nucleic Acid Hybridisation Using DNA Covalently
Coupeled to Cellulose.

Cell, 5: 301-310

Ohkubo, H., Kageyama, R., 1983

Ujihara, M., Hirose, T., Inayama, S., Nakanishi, S.:
Cloning and sequence analysis of cDNA for rat
angiotensinogen.

PNAS, 80: 2196-2200

Okamura, T., Clemens, D., Inagami, T.: 1981

Renin, angiotensins, and angiotensin-converting
enzyme in neuroblastoma cells: Evidence for
intracellular formation of angiotensins.

PNAS, 78: 6940-6943

Osswald, H., Hermes, H., Nabakowski, G.: 1982

Role of adenosine in signal transmission of
tubuloglomerular feedback.

Kidney International, 22 (Suppl.12):136-142

- Panthier, J.J., 1984
Dreyfus, M., Roux, T.L., Rougeon, F.:
Mouse kidney and submaxillary gland renin genes
differ in their 5' putative regulatory sequences.
PNAS, 81: 5489-93
- Panthier, J.J., Foote, S., 1982a
Chambrand, B., Strosberg, A., Corvol, P., Rougeon, F.
Complete Amino acid sequence and maturation of the
mouse submaxillary renin precursor.
Nature, 298: 90-92
- Panthier, J.J., Holm, J., Rougeon, F.: 1982b
The mouse Rn Locus: S allele of the renin regulator
gene results from a single structural gene
duplication.
EMBO J., 1: 1417-1421
- Panthier, J.J., Rougeon, F.: 1983
Kidney and submaxillary gland renins are encoded by
two non-allelic genes in Swiss mice.
EMBO J., 2: 675-678

Pardue, M.L., Gall, J.G., 1975

Nucleic Acid Hybridization to the DNA of cytological preparations.

In: Prescott DM (ed), Methodes in cellular Biology, Academic Press, New York, vol.21: 413

Peach, M.J.: 1977

Renin-angiotensin system. Biochemistry and mechanism of action.

Physiol. Rev., 57: 313-370

Peter, S.: 1976

Ultrastructural studies on the secretory process in the epithelioid cells of the juxtaglomerular apparatus.

Cell. Tiss. Res., 168: 45-53

Ploth, D., Roy, R.: 1982

Renin-angiotensin influences on tubuloglomerular feedback activity in the rat.

Kidney International, 22 (Suppl. 12):114-121

- Ryan, G.B., 1982
Alcorn, D., Coghlan, P., Hill, A., Jacobs, R.:
Ultrastructural morphology of granule release from
juxtaglomerular myoepitheloid and peripolar cells.
Kidney International, 22 (Suppl. 12): 3-8
- Reid, J., Morris, B., Ganong, W.: 1978
The Renin-Angiotensin System.
Ann. Rev. Physiol., 40: 377-410
- Rightsel, W., 1982
Okamura, T., Inagami, T., Pitcock, J., Takii, Y.,
Brooks, B., Brown, P., Muirhead, E.:
Juxtaglomerular Cells Grown as Monolayer Cell Culture
contain Renin, Angiotensin I-Converting Enzyme, and
Angiotensins I und II/III.
Circ. Res., 50: 822-829
- Robertson, A.L., Khairallah, P.A.: 1971
Angiotensin: Rapid lcalization in nuclei of smooth
and cardiac muscle.
Science, 172: 1138-1140

- Roith, J. 1980
Interaction of antigen and antibody in Essential Immunology, Blackwell Scientific Publications, pp: 137-171
- Roop, D.R., Nordstrom, J.L., 1978
Tsai, S.Y., Tsay, M.J., O'Malley, B.W.:
Transcription of Structural and Intervening Sequences in the Ovalbumin Gene and Identification of Potential Ovalbumin mRNA Precursors .
Cell, 15:671-658
- Rosenfeld, M., 1983
Mermod, J., Amara, S., Swanson, L., Sawchenko, P., Rivier, J., Vale, W. Evans, R.:
Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing.
Nature, 304: 129-135
- Rothman, J.E.: 1985
Der Golgiapparat.
Spektrum der Wissenschaft, 11:

Ryan, G.,

Alcorn, D., Coghlan, J., Hill, P., Jacobs, R.:
Ultrastructural morphology of granule release from
juxtaglomerular myoepithelioid and peripolar cells.
Kidney International, 22 (Suppl. 12):3-8

Sakano, H., 1979

Rogers, J.H., Hüppi, K., Brack, C., Traunecker, A.,
Maki, R., Wall, R., Tonegawa, S.:
Domains and the hinge region of an immunoglobulin
heavy chain are encoded in separate DNA Segments.
Nature, 277: 627-633

Scheidereit, C., 1983

Geisse, S., Westphal, H., Beato, M.:
The glucocorticoid receptor binds to defined
nucleotide sequences near the promoter of mouse
mammary tumor virus.
Nature, 304: 749

Schnermann, J., Ploth, D.W., Hermle, M.: 1976

Activation of tubuloglomerular feedback by chloride
transport
Pfluegers Arch., 362: 229-240

- Schnermann, J., Wright, F.S., 1970
Davis, J.M., von Stackelberg, W., Grill, G.:
Regulation of superficial nephron filtration rate by
tubuloglomerular feedback.
Pfluegers Arch., 318: 147-175
- Schnermann, J., Schubert, G., Briggs, J.P.: 1982
In situ studies of the distal convoluted tubule in the
rat. Evidence for NaCl secretion.
Am. J. Physiol., 243: 160-166
- Shnermann, J., Briggs, J.: 1985
Function of the Juxtaglomerular Apparatus: Local
Control of Glomerular Hemodynamics in: The Kidney:
Physiology and Pathophysiology. Edited by D. W. Seldin
and Giebisch, Raven Press, New York
- Skeggs, L.T., 1958
Lentz, K. E., Kahu, J.R., Shumway, N.P.:
The synthesis of a tetradecapeptide renin substrate.
J. Exp. Med., 108: 283-297
- Sogawa, K., Fuji-Kuriyama, Y., 1983
Mizukami, Y., Ichihara, Y., Takahashi, K.:
Primary Structure of Human Pepsinogen-Gen.
The Journal of Biological Chemistry, 258: 5306-5311

- Soubrier, F., 1983
Panthier, J.J., Corvol, P., Rougeon, F.:
Molecular cloning and nucleotide sequence of a human
renin cDNA fragment.
Nucleic Acid Res., 11: 7181-90
- Southern, E.M.: 1975
Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments
separated by Gel Elektrophoresis.
J. Mol. Biol., 98:503-517
- Sraer, J., 1974
Sraer, J., Ardaillou, R., Mimoune, O.:
Evidence for renal glomerular receptors for
angiotensin II.
Kidney International, 6:241-246
- Tanaka, T., Ohkubo, H., Nakanishi, S.: 1984
Common structural organization of the angiotensinogen
and the α_1 -antitrypsin genes.
J. of Biol. Chemistry, 259: 8063-8065
- Taugner, R., Hackenthal, E.: 1981
Angiotensin II in epitheloid (renin containing)
cells of rat kidney.
Histochemistry, 72:499-509

Taugner, R., 1982

Hackenthal, E., Helmchen, U., Ganten, D.,
Kugler, P., Marin-Grez, M., Nobiling, R., Unger, T.,
Lockwood, J., Keilbach, R.:

The intrarenal RAS. An immunocytochemical study on
the localization of renin, angiotensinogen,
converting enzyme, and the angiotensins in the
kidney.

Klin. Wochenschr., 60: 1218-1222

Taugner, R., 1982a

Hackenthal, E., Rix, E., Nobiling, R., Poulsen, K.:
Immunocytochemistry of the RAS: renin,
angiotensinogen, angiotensin I, angiotensin II, and
converting enzyme in the kidney of mice.

Kidney International, 22: 33-43

Taugner, R., 1984

Mannek, E., Nobiling, R., Bührle, C.,
Hackenthal, E., Ganten, D., Inagami, T., Schröder, H.:
Coexistence of renin and angiotensin II in epitheloid
cell granules of rat kidney.

Histochemistry, 81: 39-45

- Tewskbury, D.A., Dart, R.A., Travis, J.: 1979
Studies on characterization of human renin substrate.
Circulation Res. 60: 132
- Thurau, K., Deetjen, P., Kramer, K.: 1960
Hämodynamik des Nieren-markes. II. Wechselbeziehung
zwischen vaskulären und tubulären Gegenstromsystem
bei arteriellen Drucksteigerungen, Wasserdiurese und
osmotische Diurese.
Pfluegers Arch. ges. Physiol., 270
- Thurau, K., Schnermenn, J.: 1965
Die Natriumkonzentration an den Macula densa Zellen
als regulierender Faktor für das Glomerulumfiltrat
(Mikropunktionsversuche).
Klin. Wochenschrift, 43: 410-413
- Thurau, K., 1972
Dalheim, H., Grunner, A., Mason, J., Granger, P.:
Activation of renin in the single juxtaglomerular
apparatus by sodium in the tubular fluid at the
Macula densa.
Circulation Res., 38 (Suppl.2):183-186

- Thurau, K.: 1974a
Modification of angiotensin-mediated tubuloglomerular
feedback by extracellular volume.
Kidney International, 8 (Suppl. 14): 202-207
- Thurau, K.: 1974b
Renal haemodynamics.
Am. J. Med., 36: 689-719
- Thurau, K., Mason, J.: 1974c
The intrarenal function of the juxtaglomerular
apparatus, in Kidney and Urinary Tract Physiology,
MTP International Review of Science, Series 1,
Physiology, edited by Thurau, K., London,
Butterworths, 1974, vol. 6: 357-389.
- Thurau, K., Boylan, J.W.: 1976
Acute renal succes. The unexpected logic of oliguria
in acute renal failure.
Am. J. Med., 61: 308-315
- Thurau, K., Grüner, A., Mason, J., Dalheim, H.: 1982
Tubular signal for the renin activity in the
juxtaglomerular apparatus.
Kidney International, 22 (Suppl. 12): 55-62

- Travis, J., Salvesen, G. S.: 1983
Human Plasma Proteinase Inhibitors.
Ann. Rev. Biochem., 52: 655-709
- Wilson, M., Erdos, G., Wilson, D., Taylor A.: 1978
Location on chromosome 1 of Rnr, a gene that
regulates renin.
.
- Wilson, M., Taylor, A.: 1982
Genetic Regulation of thermostability of mouse
submandibular gland Renin.
J. Biol. Chem., 257: 217-223

LEBENS LAUF

2. 04. 1953	Geboren in Gleiwitz
1960 - 1968	Grundschule Gleiwitz
1968 - 1971	Gymnasium Gleiwitz
1971 - 1975	Gymnasium Speyer
1975	Abitur
1975 - 1979	University of Houston, Houston/USA
1979	Bachelor of Science
	Fachbereich Biologie
1979 - 1980	Forschungsassistentin an der
	University of Houston
	Fachbereich: Biochemie
	Lehrstuhl: Neurochemie
1981 - 1983	Studium der Biologie
	Ludwig-Maximilians-Universität,
	München
1983	Diplomexamen
1983 - 1984	Diplomarbeit am Institut für Mole-
	kularbiologie I, Zürich
1984 - 1986	Doktorarbeit am Physiologischen
	Institut der Ludwig-Maximilians-
	Universität München

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt besonders Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. Klaus Thureau, der es mir ermöglichte diese Arbeit an seinem Institut durchzuführen. Für seine intensive Betreuung und sein stetes Wohlwollen bin ich ihm zu tiefen Dank verpflichtet.

Herrn Drs. Urs Heimgartner, Institut für Biotechnologie, Zürich, möchte ich für seine Bereitschaft zu kritischen Diskussionen, die entscheidende Impulse lieferten, herzlich danken.

Herrn Drs. Alex Hans-Peter, Institut für Biotechnologie, Zürich, danke ich für das Lesen des Manuskriptes und seine hilfreichen Bemerkungen.

Frau Sesselmann und Frau Vogl danke ich besonders herzlich für die Mithilfe beim Schreiben dieser Arbeit.

